



UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA
Departamento de Anatomía Patológica y Ciencias Forenses

**VALOR DE LA TÉCNICA FISH PARA LA
DETECCIÓN DE TRANSLOCACIONES EN
LINFOMAS NO HODGKIN.**

**Linfoma Folicular, Linfoma de Células del Manto
y Linfoma B de Células Grandes.**

Memoria presentada por
MARTA TOJO CASTRO
Para optar al Grado de Doctor en Biología.

Santiago de Compostela, 30 de Abril de 2009.

D. MÁXIMO FRAGA RODRÍGUEZ Y D. JERÓNIMO FORTEZA VILA,
CATEDRÁTICOS DEL DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA Y
CIENCIAS FORENSES DE LA UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA,

INFORMAMOS

Que la Licenciada en Biología D. Marta Tojo Castro, realizó el presente trabajo, titulado: “VALOR DE LA TÉCNICA FISH PARA LA DETECCIÓN DE TRANSLOCACIONES EN LINFOMAS NO HODGKIN. Linfoma Folicular, Linfoma de Células del Manto y Linfoma B de Células Grandes”, bajo nuestra dirección, para optar al Grado de Doctora en Biología. Trabajo que consideramos concluido, autorizando su presentación ante el Tribunal Calificador.

Y para que así conste, expedimos el presente informe en Santiago de Compostela, el 30 de Abril del 2009.

Dr. Máximo Fraga Rodríguez

Dr. Jerónimo Forteza Vila

ELENA

ANGEL

SONIA

JOSE

LUZ

RAQUEL

DR BARROS

PAULA

ROSANNA

LUISA

DRA EUGENIEVA

DR FRAGA

DR FORTEZA

MANUEL

ARANCHA

DR GARCÍA-CABALLERO

CARRY

JAVI

DR ABDULKADER

DRA SOBAS

EZEQUIEL

DRA PINTOS

**A TODOS VOSOTROS QUE DE ALGUNA HABEIS
CONTRIBUIDO PARA QUE ESTE TRABAJO SEA
POSIBLE**

CONCHITA

MANOLO

MARIA

JOSÉ

ESTHER

MANOLO

CONCHA

CRIS

HELGA

BEA

ALEX

PAULA

ANA

DUBI

A Bea Dubert y a todos los que la
ciencia llega demasiado tarde.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

Ácido cítrico: Ácido 3-Hidroxi-1,3,5-pentatricarboxílico.

Ag: Antígeno.

ARN: Ácido ribonucleico.

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero.

ATM: Ataxia telangiectasia mutated.

BCL1: B-cell leukemia/lymphoma 1.

BCL2: B-cell leukemia/lymphoma 2.

BCL6: B-cell leukemia/lymphoma 6.

BCR: *B cell receptor.*

CALA: Antígeno de la leucemia linfocítica aguda común.

C: Región constante de las IgH.

CCND1: Ciclina D1.

CD: *Cluster differentiation.*

CG: Centro germinal.

CDK: Ciclina dependiente de kinasa.

CDR1: Complementary determining regions.

D: Región de diversidad de las IgH.

DAPI: 4'-6'-diamidino-2-feniloide.

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético.

Fig: Figura.

FISH: Fluorescence in situ hybridization.

FR: *Framework.*

Icr: Intermedial cluster region.

Ig: Inmunoglobulina.

IgH: Cadena pesada de las inmunoglobulinas.

IgL: Cadena ligera de las inmunoglobulinas.

IPI: Índice pronóstico internacional.

J: *Joining*, de unión.

Kb: Kilobases.

Na SCN: Tiocianato sódico.

MYC: Myelocytomatosis viral oncogene homolog.

LB: Linfoma de Burkitt.

LBCG: Linfoma B difuso de Células Grandes.

LDH: Lactato deshidrogenasa.

LNH: Linfoma no Hodgkin.

LCM: Linfoma de Células del Manto.

LF: Linfoma Folicular.

LSI: Sondas de *locus* específico.

MMC: Major mutation cluster.

MBR: Major breakpoint region.

mcr: Minor cluster region.

MO: Médula ósea

MTC: Major translocation cluster.

mTCs: Minor translocation cluster.

N: Negativa.

NV: No valorable.

ND: No diagnosticado.

OS: Supervivencia global.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

REAL: Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms.

SB: Southern blot.

SI: Sistema inmune.

SSR: Secuencias señalizadoras recombinantes

Pb: Pares de bases.

P: Positiva.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

RT-PCR: Real time polymerase chain reaction.

S: Región *switch* de las IgH.

SSC: *Standar Saline Citrate Buffer*.

TA: Temperatura ambiente.

TdT: Deoxinucleotidil transferasa terminal.

T-E: Tris-Edta.

V: Región variable de las IgH.

vcr: *Variant cluster region*.

1.	INTRODUCCIÓN	1
1.1.	LINFOMAS: CONCEPTO Y CLASIFICACIÓN	5
1.1.1.	LINFOMA FOLICULAR	7
1.1.2.	LINFOMA DE CÉLULAS DEL MANTO	9
1.1.3.	LINFOMA B DIFUSO DE CÉLULAS GRANDES	10
1.2.	GENES IMPLICADOS EN LA PATOGENIA DE LOS LNH	12
1.2.1.	GENES DE LAS CADENAS PESADAS DE LAS INMUNOGLOBULINAS	14
1.2.2.	GEN DE <i>BCL2</i> . TRANSLOCACIÓN t(14;18)(q32;q21)	18
1.2.3.	GEN DE LA <i>CICLINA D1</i> . TRANSLOCACIÓN t(11;14)(q13;q32)	24
1.2.4.	GEN DE <i>BCL6</i> . ALTERACIONES CROMOSÓMICAS DEL 3q27	28
1.2.5.	GEN DE <i>MYC</i> . TRANSLOCACIÓN t(8;14)(q24;q32)	33
1.3.	DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE LOS LINFOMAS B	36
1.3.1.	DETECCIÓN DE CLONALIDAD	36
1.3.2.	DETECCIÓN DE TRANSLOCACIONES	39
1.3.2.1.	Técnica de PCR	41
1.3.2.2.	Técnica de FISH: Definición. Etapas principales. Sondas	43
2.	JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	57
3.	MATERIAL Y MÉTODOS	61
3.1.	MATERIAL	63
3.2.	MÉTODOS	63
3.2.1.	PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS	63
3.2.2.	TÉCNICA DE FISH	64
3.2.2.1.	Optimización de las soluciones y las temperaturas	65
3.2.2.2.	Optimización de los tiempos de digestión	67
3.2.2.3.	Comparación entre sondas: colocalización o separación	69
3.2.2.4.	Niveles de corte	73
3.2.2.5.	Aplicación de la técnica de FISH	73
3.2.3.	TÉCNICA DE PCR	73

3.2.4.	TÉCNICA DE INMUNOHISTOQUÍMICA	76
3.2.5.	ESTUDIO DE CORRELACIÓN CON LA EVOLUCIÓN CLÍNICA Y LA SUPERVIVENCIA.	77
4.	RESULTADOS	79
4.1.	OPTIMIZACIÓN DE LA TÉCNICA FISH	81
4.1.1.	SOLUCIONES DE LAVADOS Y TEMPERATURAS	81
4.1.2.	OPTIMIZACIÓN DE LOS TIEMPOS DE DIGESTIÓN	81
4.1.3.	ELECCIÓN DE LA SONDA ADECUADA	82
4.1.4.	NIVELES DE CORTE	82
4.2.	LINFOMA FOLICULAR	82
4.2.1.	DETECCIÓN DEL DÍMERO BCL2-IGH Y REORDENAMIENTO DE <i>BCL6</i> MEDIANTE FISH	83
4.2.2.	RELACIÓN ENTRE LA t(14;18)(q32;q21), REORDENAMIENTO DE <i>BCL6</i> Y GRADO HISTOLÓGICO EN LF	83
4.2.3.	ESTUDIO COMPARATIVO FISH-PCR PARA DETECCIÓN DE t(14;18)(q32;q21)	84
4.2.4.	COMPARACIÓN ENTRE LAS TRANSLOCACIONES Y EXPRESIÓN PROTEICA DE <i>BCL2</i> Y <i>BCL6</i>	84
4.3.	LINFOMA DE CÉLULAS DEL MANTO	85
4.3.1.	DETECCIÓN DEL DÍMERO CCND1-IGH MEDIANTE FISH	85
4.3.2.	ESTUDIO COMPARATIVO FISH-PCR PARA DETECCIÓN DE t(11;14)(q13;q32)	85
4.3.3.	COMPARACIÓN ENTRE LA TRANSLOCACIÓN Y EXPRESIÓN PROTEICA DE CCND1	86
4.4.	LINFOMA B DIFUSO DE CÉLULAS GRANDES	86
4.4.1.	DETECCIÓN DE LOS REORDENAMIENTOS DE BCL2, BCL6 Y MYC	86
4.4.2.	COMPARACIÓN ENTRE LOS REORDENAMIENTO Y EXPRESIÓN PROTEICA DE BCL2 Y BCL6	87
4.4.3.	IMPLICACIÓN DE LAS ALTERACIONES GENÉTICAS EN EL PRONÓSTICO Y LA SUPERVIVENCIA	88
4.5	FIGURAS	90
4.6	TABLAS	97

5.	ARTÍCULOS PUBLICADOS	109
6.	DISCUSIÓN	117
6.1.	ASPECTOS METODOLÓGICOS DE LA TÉCNICA DE FISH EN EL MATERIAL HISTOLÓGICO DE RUTINA	119
6.1.1.	VISUALIZACIÓN E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS	123
6.1.2.	ELECCIÓN DE LA SONDA	125
6.2.	ESTUDIO COMPARATIVO FISH-PCR PARA DETECCIÓN DE LAS TRANSLOCACIONES	126
6.3.	LINFOMA FOLICULAR	130
6.3.1.	DETECCIÓN DEL DÍMERO BCL2-IGH Y REORDENAMIENTO DE BCL6 MEDIANTE FISH. RELACIÓN ENTRE LA t(14;18)(q32;q21), REORDENAMIENTO DE BCL6 Y GRADO HISTOLÓGICO EN LF	130
6.3.2.	TRANSLOCACIONES Y EXPRESIÓN PROTEICA	133
6.4.	LINFOMA DE CÉLULAS DEL MANTO	134
6.4.1.	DETECCIÓN DEL DÍMERO CCND1-IGH MEDIANTE FISH	134
6.4.2.	TRANSLOCACIONES Y EXPRESIÓN PROTEICA	135
6.5.	LINFOMA B DIFUSO CÉLULAS GRANDES:	136
6.5.1.	DETECCIÓN DE LOS REORDENAMIENTOS DE BCL2, BCL6 Y MYC.	136
6.5.2.	TRANSLOCACIONES Y EXPRESIÓN PROTEICA	138
6.5.3.	IMPLICACIÓN DE LAS ALTERACIONES GENÉTICAS EN EL ANÁLISIS PRONÓSTICO Y LA SUPERVIVENCIA	139
7.	CONCLUSIONES	143
8.	BIBLIOGRAFÍA	147

1. Introducción

Las neoplasias linfoides se entienden como proliferaciones clonales originadas a partir de una única célula B o T, que frecuentemente refleja un determinado estadio de maduración.

Realizar una clasificación diferenciada y precisa de los linfomas ha constituido siempre una fuente de discusión y controversia para clínicos, patólogos e investigadores básicos, presentando problemas para determinar un diagnóstico. De ahí la importancia de recopilar el mayor número de datos acerca de ellas y correlacionar la información clínica, morfológica, fenotípica y genética.

En los inicios, el diagnóstico histopatológico de las neoplasias linfoides dependía exclusivamente del reconocimiento de las alteraciones morfológicas, mediante un examen microscópico: detallando el patrón histológico, la citología (linfocito o histiocito)¹ y el patrón de diferenciación celular (bien diferenciado o pobremente diferenciado). En algunos casos, las características morfológicas por sí solas, no son concluyentes para afirmar que un proceso es maligno o benigno, sobre todo cuando se trata de linfomas extremadamente polimorfos, en lugar de ser una población monótona de células neoplásicas.

A mediados de los 70 aparecen nuevas técnicas de diagnóstico que complementan a las morfológicas. Se trata de técnicas inmunohistoquímicas desarrolladas para hacer un estudio inmunofenotípico, que ayudan a discriminar y determinan la estirpe celular B².

En la última década se produce un avance en el conocimiento de los linfomas, gracias al desarrollo de las técnicas moleculares, que permiten determinar la clonalidad de los procesos linfoides e identificar translocaciones cromosómicas características. Estas técnicas son de gran ayuda en el diagnóstico de tumores no concluyentes morfológica o inmunofenotípicamente y han sido incorporadas gradualmente a la rutina diagnóstica de los laboratorios de Anatomía Patológica. Sus resultados han de ser interpretados, dentro de un contexto clinicopatológico, como una herramienta más de ayuda en el diagnóstico diferencial.

De hecho, el diagnóstico de los procesos linfoproliferativos debe tener en cuenta la información procedente de:

- Estudio Clínico.
- Estudio Histológico.

- Estudio Inmunofenotípico.
- Estudio molecular y citogenético.

Es importante recalcar que cualquier resultado ha de ser interpretado en el contexto de estos criterios. Realizar una buena correlación entre los datos clínicos, morfológicos, fenotípicos, y genéticos es clave para un diagnóstico correcto y preciso.

1.1. LINFOMAS; CONCEPTO Y CLASIFICACIÓN.

Los linfomas o neoplasias linfoides son procesos proliferativos clonales malignos que comprenden varios grupos de entidades. En muchos casos, aunque no en todos, el fenotipo de la célula neoplásica se parece mucho al de un determinado estadio de la diferenciación normal de los linfocitos, dato que se utiliza en el diagnóstico y la clasificación de estos procesos.³

La inmensa mayoría de las neoplasias linfoides (80-85%) tienen su origen en las células B, y casi todas las restantes son tumores de células T; muy raras veces se observan tumores derivados de las células NK o de origen histiocítico.³

Clásicamente, se consideran que todas las neoplasias linfoides son malignas, pero se observan comportamientos muy variables desde las formas aparentemente benignas hasta otras que son rápidamente mortales.³

La clasificación y descripción de los linfomas, ha ido evolucionando paralelamente con la aparición de nuevas técnicas. Así encontraremos multitud de clasificaciones cada vez de mayor precisión, desde la primera descripción de los linfomas atribuida a Thomas Hodgkin⁴ en 1832 hasta nuestros días.

En 1994 la “*Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms*” realiza una clasificación, sustento de la clasificación realizada en 2001 por la “*World Health Organization Classification of Tumour*”^{5, 6}, modificada en el 2003 y la vigente publicada en el 2008⁷. Se trata de una clasificación específica de los tumores hematopoyéticos y tejido linfoide, en donde se da prioridad a la simplificación, evitando hacer una clasificación compleja y de menor valor práctico. Sólo se reconocen enfermedades con rasgos característicos, tanto morfológicos como clínicos. Se establecen grados histológicos y grupos pronósticos.

Dentro del amplio grupo de los linfomas, hay que separar, a la *enfermedad de Hodgkin* (EH) (Linfoma de Hodgkin) de las otras formas que constituyen los *Linfomas no Hodgkin* (LNH), ya que presentan diferencias clínicas, histológicas y reciben distinto

tratamiento. Nuestro estudio se centrará en 3 tipos de LNH: LF (Linfoma Folicular), LCM (Linfoma de Células del Manto) y LBCG (Linfoma B de Células Grandes), en la tabla 1 mostramos su clasificación.

Células precursoras

Leucemia/Linfoma linfoblástica B

Células maduras

Leucemia linfocítica crónica B/Linfoma de linfocitos pequeños.

Leucemia prolinfocítica B.

Linfoma B esplénico de la zona marginal (+/-linfocitos vellosos).

Leucemia de células peludas.

Linfoma linfoplasmocítico.

Linfoma folicular.

Linfoma de células del manto.

Linfoma B de la zona marginal, del tejido linfoide asociado a mucosas.

Linfoma ganglionar de la zona marginal.

Linfoma B difuso de células grandes:

Linfoma primario de cavidades

Linfoma primario mediastínico.

Linfoma de Burkitt.

Granulomatosis linfomatoide.

Neoplasias de células plasmáticas:

Mieloma múltiple.

Plasmocitoma.

Gammapatía monoclonal de significado incierto.

Enfermedades por depósito de inmunoglobulina.

Amiloidosis y otras.

Tabla 1. Clasificación de la Organización Mundial de la Salud de los linfomas B.

Esta clasificación ha sido posible gracias a la progresión en los campos de la inmunología, citogenética y biología molecular, convirtiendo estas técnicas en herramientas indispensables para el estudio de estas neoplasias.

Con respecto a las características genéticas existen reordenamientos estructurales bien definidos y de gran ayuda para el diagnóstico en LF, LCM y LBCG. Dichos

reordenamientos, que más adelante describiremos en profundidad, se pueden detectar mediante técnicas de PCR y FISH.

A continuación realizamos una revisión de las características más sobresalientes de estos LNH que en conjunto constituyen la mayor parte de los Linfomas B.

1.1.1. LINFOMA FOLICULAR.

El Linfoma Folicular (LF) es un subtipo de linfoma no Hodgkin de fenotipo B. Representa alrededor del 22-40% de todos los linfomas⁸. Es un tumor derivado de linfocitos del centro germinal, caracterizado por la sobreexpresión de la proteína BCL2. Denominado folicular ya que la célula tiende a crecer en patrón circular o nodular en los ganglios linfáticos. Presenta un crecimiento lento e indolente. La edad media de presentación es superior a 30 años, siendo raro verlos en individuos más jóvenes⁹.

Morfología: Prácticamente todos los casos muestran un patrón folicular aunque puede afectar tan sólo a una fracción del ganglio biopsiado. Ocasionalmente, la demostración del patrón folicular puede requerir inmunotinción para células dendríticas (CD21 o CD23). La citología muestra siempre una mezcla de centrocitos y centroblastos, si bien lo hace en proporción variable. Además existen abundantes células foliculares dendríticas y linfocitos T entremezclados con el tumor, hasta el punto de que la abundancia de células T puede llegar a enmascarar a las células neoplásicas.

Grado del linfoma: El conocimiento del grado del linfoma folicular es de importancia capital a la hora de plantear el tratamiento más adecuado.

Atendiendo a la proporción relativa del centroblasto, se consideran como grados citológicos provisionales los siguientes:

- Grado I: de 0-15 centroblastos por hpf (*high-power field* de 0.159 mm²)
- Grado II: Mixto, células pequeñas y grandes. 6-15 centroblastos por hpf
- Grado III: células grandes. Predominio de centroblastos. Aquí habrá que distinguir entre Grado IIIa (presencia de centrocitos) y Grado IIIb (ausencia de centrocitos).

Los diferentes estudios de correlación clínica, muestran que el grado III se asocia con una conducta clínica más agresiva, si bien su reconocimiento tiene una baja reproducibilidad. Específicamente se ha encontrado que el tiempo libre de enfermedad es más corto en linfomas de grado III, aunque la supervivencia global no parece diferir significativamente¹⁰.

Desde el punto de vista práctico se agrupan los grados I y II como tumores de bajo grado histológico y el III como tumores de alto grado, algo que ahora reconoce la clasificación de la OMS del 2008^{7, 11, 12}.

Inmunofenotipo: expresan antígenos asociados a células B tales como CD19, CD20, CD22, además pueden expresar BCL2+, BCL6+, CD10+, IgG de superficie. Algunos casos, especialmente el grado IIIb, pueden ser CD10-, pero mantienen la expresión de BCL6^{13, 14}. El 85% de los LF muestran alta expresión de la proteína BCL2. Esta expresión se ha convertido en un rasgo útil de diagnóstico que permite identificar fases precoces del LF.

Son negativos para los receptores de antígenos: IgM+/-, IgD-, CD43-, CD23-, CD5-

La inmunotinción para marcadores de células dentríticas foliculares revela la presencia de una malla densa soportando células tumorales. Otro rasgo característico son los folículos neoplásicos con bajo índice proliferativo mediante inmunotinción con Ki67 en casos de bajo grado¹⁵.

Características genéticas: alrededor del 85% de los LF sufren reordenamientos que afectan al gen *BCL2*. La variante frecuente es la t(14;18)(q32;q21), otras variantes son t(2;18)(p12;q21) y la t(18;22)(q21;q11). Dichas alteraciones están presentes en el 85-90% de los linfomas de grado I y II y en un 59 % los de grado IIIa.¹⁶ Sin embargo esta alteración no es característica de los linfomas de grado IIIb, ya que tan solo aparece en un 13%^{10, 17}, ni para los linfomas cutáneos con ausencia de la translocación y expresión de la proteína BCL2.

Existe un pequeño subgrupo de linfomas foliculares que no expresan BCL2 y sin embargo suelen caracterizarse por tener la t(3;14) u otra de las alteraciones estructurales 3q27 situada en el locus de *BCL6*¹⁷. Normalmente se corresponde con linfomas de grado IIIb, lo que apunta a que se trata de un subtipo biológico diferente¹⁸. Esta translocación

también puede presentarse asociada al mismo tiempo que t(14;18)(q32;q21) o junto a otras alteraciones que también involucran al locus de *BCL2* como puede ser la trisomía 18.

1.1.2. LINFOMA DE CÉLULAS DEL MANTO.

El Linfoma de Células del Manto (LCM) es un subtipo de linfoma no Hodgkin de fenotipo B que representa entre un 3 - 10% de todos los linfomas¹⁹.

Se origina a partir de un proceso linfoproliferativo de un subgrupo de células B en un estadio previo al paso por el centro germinal. Se caracteriza por una proliferación monomorfa de linfocitos vírgenes entre tamaño pequeño e intermedio²⁰.

El comportamiento biológico de LCM es muy agresivo, con una supervivencia media de 3-5 años.

Ocurre en individuos de edad avanzada con una media de 60 años y principalmente en varones^{21, 22}.

Grado de linfoma: histológicamente puede presentar un patrón de crecimiento en la zona del manto, nodular o difuso y muy rara vez un patrón folicular²³⁻²⁵. Aunque clásicamente se ha postulado que la citología de los LCM es monomorfa, estos tumores pueden mostrar cierto grado de variabilidad citológica, más acentuada cuando las células tumorales que infiltran los centros germinales.

Morfológicamente se distinguen dos variantes muy agresivas:

- **Blastoide:** es la variante más agresiva, las células presentan una morfología similar a los linfoblastos con cromatina dispersa y alto índice mitótico.
- **Pleomórfica:** las células son muy pleomórficas y aunque poseen un núcleo ovalado de contorno irregular con un citoplasma claro y prominente nucleolo en al menos algunas células.

Otras formas menos frecuentes de LCM son: el LCM de células pequeñas y el linfoma *Marginal Zone-Like*.

Inmunofenotipo: los LCM expresan como marcadores de células B: CD19, CD20, además se caracterizan por ser CD43+, CD5+, IGD+/- y CD23 -, CD10 -, BCL6 - . También es típica la demostración de una malla laxa de células dentríticas.

Otro signo definitivo de LCM es la sobreexpresión de la ciclina D1 (CCND1) presente en el 100% de los casos, aunque algunos estudios encuentran expresión de ciclina D1 en tan sólo el 70%¹¹.

Características genéticas: los LCM se caracterizan por la presencia de una alteración citogenética considerada como primer evento la $t(11;14)(q13;q32)^{26-28}$, aunque también existen otros reordenamientos menos comunes tales como la $t(2;11)(q11;q13)$ y la $t(11;22)(q13;q11)^{29}$. Estas translocaciones parecen ser las causantes de la sobreexpresión de la ciclina D1.

La identificación de muy pocas o ninguna mutaciones somáticas en los genes de inmunoglobulinas en la mayoría de los LCM ha confirmado su origen en células previas al centro germinal.

El LCM puede ser difícil de diferenciar citológicamente de otros linfomas no Hodgkin, sobre todo cuando se encuentra en su fase leucémica, ya que podría confundirse con la Leucemia Linfocítica Crónica; otro ejemplo sería el de biopsias gastrointestinales donde pueden plantearse problemas de diagnóstico diferencial con otros linfomas menos agresivos^{30, 31, 32}. En estos casos la detección de la translocación $t(11;14)(q13;q32)$ mediante FISH podría ser muy útil.

Con menos frecuencia se encuentran otras alteraciones moleculares o deleciones en LCM que afectan al gen de la *ATM* (*ataxia telangiectasia mutated*)²⁰.

1.1.3. LINFOMA B DIFUSO DE CÉLULAS GRANDES.

El Linfoma B Difuso de Células Grandes (LBCG) es un subtipo de linfoma no Hodgkin de fenotipo B. Más que una entidad precisa se trata de un grupo heterogéneo de linfomas B agresivos, con una clínica, morfología, inmunohistoquímica y características genéticas muy variadas. Representan alrededor del 25-30% de todos los LNH⁸. Se caracteriza por la proliferación difusa de células grandes neoplásicas B, con núcleos de

igual o mayor tamaño que los de los macrófagos, o que presentan el doble de tamaño de los linfocitos normales⁷.

Las características clínicas, morfológicas y biológicas han permitido su clasificación:

Localización primaria:

- Ganglionares.
- Extraganglionares.

Características morfológicas:

- Centroblasticos: Presentan células redondeadas y de tamaño medio respecto a las células linfoides grandes, con núcleo vesicular y citoplasma escaso.
- Immunoblásticos: A esta variante pertenece el 90% de las células de este tipo de linfomas, presentan un núcleo simple con un citoplasma muy basófilo.
- Anaplásicos: Presentan una morfología similar a las de *Reed –Sternberg*.
- Variantes morfológicas raras.

Inmunofenotipo:

- Linfomas del centro germinal. (CGB) *Germinal center-B-cell-like*.
- Linfomas fuera del centro germinal. (No-CGB) *Activated B-cell-like*³³.

Características genéticas:

- Los que pertenecen a tumores que surgen *de Novo*.
- Los que se presentan como linfomas secundarios: correspondientes a transformaciones de otros tumores menos agresivos; como por ejemplo los linfomas foliculares, linfoma marginal de células B, o los linfomas nodulares³⁴.

Inmunofenotipo: estos linfomas de células B maduras expresan marcadores: tales como CD19, CD20, otros marcadores de expresión variable son CD22, CD79, CD5, CD10

y BCL6, estos dos últimos parecen ser importantes como marcadores de los LBCG del centro germinal estando presentes en la gran mayoría de estos casos.³⁵.

Es positivo para BCL2 en el 50-60% de los casos³⁴, mientras que la ciclina D1 suele ser negativa en la mayoría de los casos que expresan CD5.

Características genéticas: es muy común la presencia de reordenamientos de IgH e IgL y muestran mutaciones somáticas en las regiones variables. Puede detectarse la translocación de IGH con BCL2 en un porcentaje aproximado del 20% de los casos. Un porcentaje mayor (alrededor del 30%) tienen translocaciones afectando a la región 3q27 (BCL6), con una frecuencia todavía mayor en los LBCG de origen extraganglionar, también existen otras alteraciones moleculares que pueden participar en la sobreexpresión alterada del proto-oncogén *BCL6*.

1.2. GENES IMPLICADOS EN LA PATOGENIA DE LOS LNH.

La característica biológica que diferencia células normales de células tumorales, es la capacidad de estas últimas de proliferar de una manera continua y con una diferenciación anómala. Estas células presentan cambios de señalización que actúan sobre la proliferación celular, diferenciación y apoptosis, causados principalmente por alteraciones genéticas tales como las translocaciones que afectan a la transcripción y expresión de las proteínas.

El mecanismo oncogenético del que derivan muchos linfomas pasa por la activación de proto-oncogenes e inhibición de genes supresores de tumores que juegan un papel en la regulación del ciclo celular, la proliferación, la diferenciación y la apoptosis. En una situación normal los proto-oncogenes son genes que estimulan la proliferación celular mientras que los genes supresores de tumores inhiben casos de proliferación celular inadecuada.

Existen diferentes mecanismos que pueden contribuir a la alteración de un gen, se trata de diferentes mutaciones. Una mutación se define como cualquier cambio en la secuencia de nucleótidos o en la ordenación del ADN. Según el nivel de afectación, las mutaciones pueden clasificarse en tres categorías:

- **Mutaciones numéricas** (genómicas): las que afectan al número de cromosomas en la célula. Se denominan también aneuploidías y pueden suponer ganancia (polisomías) o pérdida de cromosomas (monosomías).
- **Mutaciones estructurales** (cromosómicas): son cambios que implican la alteración de sólo una parte de un cromosoma. Están relacionadas con la patogenia de muchos tipos de leucemias y linfomas. Las fundamentales son las deleciones cromosómicas (pérdida de una porción cromosómica) y las translocaciones (intercambio de dos fragmentos entre cromosomas no homólogos).
- **Mutaciones de secuencia** (génicas): son alteraciones de genes individuales. Incluyen desde la sustitución de un sólo nucleótido hasta cambios que afectan a múltiples bases. Entre ellas podemos citar las inserciones (aumento de una o más pares de bases en la secuencia del ADN), las deleciones (pérdida de una o más pares de bases en la secuencia de ADN) y las amplificaciones (aumento del número de copias de un gen, que implica la sobreexpresión de la proteína codificada).

La existencia de mutaciones en el ADN de células de la línea germinal puede ser transmitida a generaciones futuras. En cambio, las mutaciones en el ADN de células somáticas, no son transmitidas. Estas últimas se producen por azar sólo en un subconjunto de células de ciertos tejidos, como así se aprecia en muchos tipos de cáncer.

El único rasgo en común de las alteraciones malignas en hematología, es su asociación frecuente con alteraciones cromosómicas estructurales, que activan la función de los proto-oncogenes e inactivan a genes supresores. Entender, identificar y caracterizar los genes implicados en estas alteraciones es esencial para comprender qué papel juegan en la génesis tumoral³⁶.

Como ya hemos mencionado los Linfomas Foliculares (LF), los Linfomas de Células del Manto (LCM) y los Linfomas Difusos de Células Grandes (LBDG) son subtipos de Linfomas no Hodgkin cuya patogénesis se encuentra relacionada con la presencia de alteraciones cromosómicas que conducen a la célula a un desarrollo anormal. Mutaciones estructurales que van a ser características para cada uno de estos tumores, convirtiéndolas en herramienta clave para su clasificación. Además, no sólo pueden ser

importantes desde el punto de vista diagnóstico y patogénico sino también, pronóstico y terapéutico³⁷.

Las translocaciones primarias asociadas a estos linfomas están esquematizadas en la tabla 2.

LINFOMA MALIGNO	TRANSLOCACIÓN	GENES INVOLUCRADOS
neoplasias de células B		
Linfoma Folicular	t(14;18)(q32;q21) t(3;14)(q27;q32)	<i>IGH/BCL2</i> <i>BCL6/IGH</i>
Linfoma de Células del Manto	t(11;14)(q13;q32)	<i>CCND1/IGH</i>
Linfoma de Burkitt	t(8;14)(q24;q32) t(2;8)(p12;q24) t(8;22)(q24;q11)	<i>MYC/IGH</i> <i>IGK/MYC</i> <i>MYC/IGL</i>
Linfoma MALT	t(11;18)(q21;q21) (q32;q21)(q32;q21) t(1;14)(p22;q33)	<i>API2/MALT1</i> <i>IGH/BCL2</i> <i>BCL10/IGH</i>
LBCG	t(14;18)(q32;q21) t(8;14)(q24;q32) t(3;22)(q27;q11) t(2;3)(q12;27)	<i>IGH/BCL2</i> <i>MYC/IGH</i> <i>BCL6/IGλ</i> <i>IGκ/BCL6</i>
neoplasias de células T		
LACG	(2;5)(p23;q35). (2;?) (p23,?)	<i>ALK/NMP</i> <i>ALK/ VARIOS</i>

Tabla 2. Translocaciones más representativas de los LNH.

1.2.1. GENES DE LAS CADENAS PESADAS DE LAS INMUNOGLOBULINAS.

IgH: (*Inmunoglobulin heavy Chain gene*). Cadena génica situada en la región 32.3 del brazo largo del cromosoma 14. Pertenece a la familia multigénica que forma parte de la región de las cadenas pesadas de las Igs. Las Igs están constituidas por: 2 cadenas pesadas

que pueden presentar 5 isotipos diferentes (μ , δ , γ , α , ϵ), y dos cadenas ligeras que pueden presentar dos isotipos diferentes ($IL\kappa$, y $IL\lambda$).

La *IgH* contiene una serie de secuencias codificadoras, llamadas segmentos génicos, se presentan separados en la línea germinal y durante la maduración génica de los linfocitos B se van aproximando. Se trata de una combinación de regiones variables formadas por los segmentos variables (V_{1-50}), de diversidad (D_{1-30}), de unión o “*joining*” (J_{1-6}), y las regiones constantes (formado por los segmentos constantes: $C\mu$, $C\delta$, $C\gamma3$, $C\gamma1$, $C\alpha1$, $C\gamma2$, $C\gamma4$, $C\epsilon$, y $C\alpha1$)³⁸, de modo que se disponen segmentos adyacentes de cada tipo para codificar la región de IgH.

Próximo a los segmentos J, en el lugar de inicio de la transcripción para el gen de *IgH*, se localiza la región $I\mu$, flanqueada por dos regiones $E\mu$, región “*enhacer mu*” que intensifica la transcripción del gen y por $S\mu$ secuencias “*switch mu*”, sugerida también como punto de rotura³⁹. (Fig 1)

Los primeros mecanismos para configurar la estructura VDJ se suceden en la fase independiente del antígeno, aquella en la que los linfocitos están madurando en la médula ósea, y previamente a su migración.

El primer mecanismo que ocurre es la **recombinación** que se desencadena en dos eventos independientes:

1. Un segmento D_H cualquiera se une con uno J_H (con inversión o delección del trozo intercalado no seleccionado). Esto ocurre en células pro-B tempranas.
2. El segmento fusionado D_H - J_H resultante se une a su vez aleatoriamente con un segmento V_H , con el que se obtiene la fusión V_H - D_H - J_H . Este mecanismo ocurre en células pro-B tardías (Fig 1)

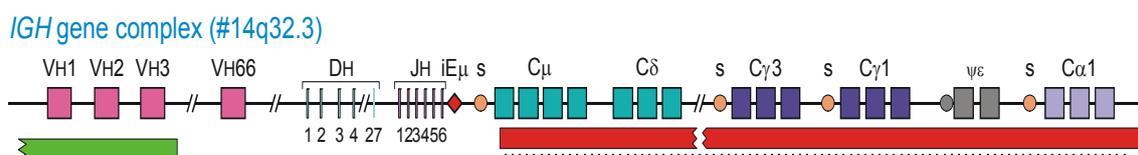


Fig 1. Complejo correspondiente a los segmentos génicos reordenados de IgH. (Tomada del Eurofish project)

El mecanismo del reordenamiento de la región variable se debe a unas secuencias señalizadoras recombinantes (*SSR*) en el ADN, son secuencias conservadas que aparecen flanqueando los segmentos VDJ; al lado 3' de cada segmento V, al lado 5' de cada segmento J, y ambos lados de cada segmento D.

Las *SSR* tienen una estructura primaria característica:

- Un heptámero palindrómico conservado.
- Un nanómero conservado, rico en AT.

Entre el heptámero y el nanómero, existe una secuencia no conservada que se caracteriza por tener 12 ó 23 nucleótidos. Esto supone que podemos distinguir dos tipos de secuencias *SSR*.

- *SSR* de una vuelta (con doce nucleótidos intercalados entre heptámero y el nanómero).
- *SSR* de dos vueltas (con veintitrés nucleótidos intercalados).

La forma de emparejarse es siempre un *SSR* de una vuelta con *SSR* de dos vueltas. En las cadenas pesadas, tanto el lado 3' de V' como el 5' de J poseen una *SSR* de dos vueltas, mientras que ambos lados de cada segmento D posee un *SSR* de una vuelta. Esta regla asegura que los segmentos V-D- J se unan en el orden adecuado.

Estas regiones provocan que la IgH sea el blanco de recombinación con otros genes.

El segundo mecanismo por el que las Igs adquieren una mayor variabilidad es la **diversidad de unión**, está caracterizada por la adición de N-Nucleótidos a nivel polipéptido. Las zonas de unión D_H - J_H y V_H - D_H contienen algunos aminoácidos que no están codificados en los respectivos segmentos VDJ. De hecho estos aminoácidos no tienen una codificación propiamente dicha, sino que vienen determinados por los llamados nucleótidos N, que se adicionan durante la fase de unión D-J, VDJ.

La reacción viene catalizada por la desoxinucleotidiltransferasa Terminal (TdT) que va añadiendo aleatoriamente hasta 15 nucleótidos, de modo que la región final la podemos representar como V_H -N- D_H -N- J_H .

El tercer mecanismo por el que las Igs adquieren un nivel adicional de variación es la **hipermutación somática**: se produce una vez que los linfocitos B entran en contacto con el antígeno y migran a los folículos linfoides para crear los centros germinales. Los genes reordenados de las regiones V, tanto de las cadenas H como L, sufren una altísima tasa de mutación, que va generando nuevas variantes de Igs a partir de la reordenación génica original.

Gracias a estos mecanismos las Igs producidas por linfocitos B son capaces de reconocer a cualquier antígeno. La suma de todos los anticuerpos distintos que puede generar un individuo^{10, 11} se conoce como repertorio de anticuerpos y su alto valor diferencial es debido a la propia organización de los genes de las inmunoglobulinas y a su peculiar mecanismo de expresión.

Por último, podríamos sugerir como cuarto mecanismo, el cambio que van a sufrir la Igs, un cambio de clase denominado: **Conmutación de la clase de la inmunoglobulina**; es un proceso biológico que tiene lugar tras la activación de los linfocitos B, lo cual le permite la producción de diferentes clases de anticuerpos (IgA, IgE, o IgG) Estas clases están definidas por las regiones constantes (C) de la cadena pesada de la Ig. Inicialmente los linfocitos B vírgenes expresan sólo IgM e IgD de superficie con regiones de unión al antígeno idénticas. Cada isotipo está adaptado para una función distinta y por tanto, tras la activación se necesita un anticuerpo con un efector IgG, IgA o IgE para la eliminación eficaz del antígeno. La conmutación de clase permite a la progenie de un solo linfocito B producir anticuerpos de diferentes isotipos. Sólo la región constante de la cadena pesada del anticuerpo cambia durante la conmutación de clase. Las regiones variables, y por tanto la especificidad de antígeno, permanece invariable. De ese modo se producen efectores con la función adecuada para cada antígeno. La conmutación de clase es iniciada por citoquinas. El isotipo generado depende de qué citoquinas estén presentes en el entorno del linfocito B.

El proceso tiene lugar en el gen de la cadena pesada por un mecanismo conocido como **recombinación de conmutación de clase** ("*class switch recombination*" o CSR) (Fig 2). Este mecanismo se basa en secuencias de nucleótidos conservadas, llamadas regiones de conmutación (*Regiones switch* o S), que se encuentran en un punto de la secuencia de ADN anterior a los genes de la región constante (excepto en la cadena δ). La hebra de ADN se escinde por la actividad de ciertas enzimas en dos regiones S concretas.

El exón del dominio variable se vuelve a empalmar mediante un proceso llamado unión de extremos no homóloga ("*non-homologous end joining*" o *NHEJ*) a la región constante elegida (γ , α o ϵ). Este proceso concluye formando un gen de inmunoglobulina que codifica un anticuerpo de un isotipo diferente.

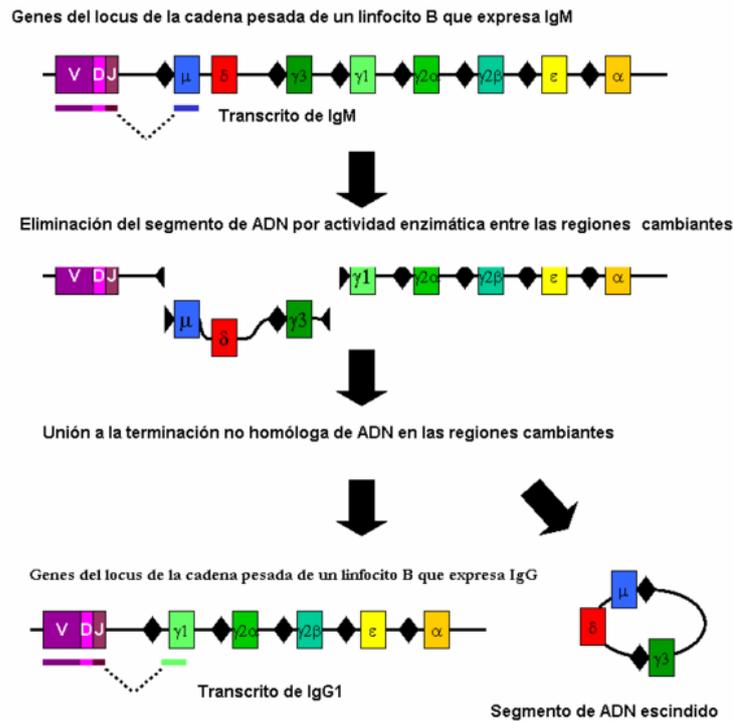


Fig 2. Representación de cómo se recombinan las diferentes clases de Igs.

1.2.2. GEN DE *BCL2* . TRANSLOCACIÓN t(14;18)(q32;q21).

BCL2 (*B-cell CLL/ lymphoma 2*) es un proto-oncogén situado en el brazo largo del cromosoma 18, banda 2, subbanda 1. Pertenece a la superfamilia de BCL2 involucrada en la regulación de la apoptosis, que codifica para miembros antiapoptóticos como son *BCL2* (*B-cell lymphoma protein 2*) *BclxL*, *Mcl1*, *Bclw* y *Bfl1* o *A1* y miembros pro-apoptóticos: como *Bax* y *Bak*.

El gen de *BCL2* media el control transcripcional por dos promotores. El promotor 5'-P1 que está localizado en 1386-1423 pb hebra arriba del lugar de inicio transcripcional,

esta región es una TATA-less, promotor rico en CG donde se une varios factores de transcripción. El otro promotor es 3'-P2 que se encuentra localizado 1.3 Kb hebra abajo del promotor 5'-P1.

El gen de *BCL2* está constituido por 3 exones. El exón 1 y la parte 3' del exón 3 son regiones no codificadoras. Las regiones codificantes de *BCL2* por "splicing" (ensamblamiento alternativo) van a dar lugar a dos transcritos que originan dos isoproteínas que difieren en su C-terminal. Presentando variaciones en la región 3'UTR.

- "*B-cell lymphoma protein 2 alpha isoform*": representa la isoforma de mayor tamaño, una proteína de 26.2 kDa (239 aminoácidos). Contiene la cola hidrofóbica que se ancla a la membrana que parece ser esencial para la función anti-apoptótica. Además contiene los dominios necesarios para la homo o heterodimerización (BH)⁴⁰.
- "*B-cell lymphoma protein 2 beta isoform*": es la isoforma más corta, con 25 kDa (205 aminoácidos).

Su misión principal es el bloqueo de la muerte por apoptosis de células linfocitarias⁴¹ confiriendo longevidad a las células en fase G₀. Los mecanismos mediante los cuales ejecuta su acción son diversos:

- BCL2 forma complejos con las caspasas 9 y Apaf1 que inhiben la cascada de proteasas que da lugar a la apoptosis. Esta función la lleva a cabo en una gran variedad de células donde además regula la permeabilidad de la membrana mitocondrial evitando la liberación del citocromo C⁴².
- Mediante la formación de dímeros con *Bax*. En la célula normal existe un balance de equilibrio entre los miembros de esta familia. *BCL2* actúa como antagonista de *Bax* en una acción recíproca. Los miembros de las familias anti y pro-apoptóticas pueden formar homo y heterodímeros y se piensa que según su concentración, actúan de una manera u otra sobre el programa apoptótico. Se ha podido comprobar que los dominios de unión con BH1, BH2 y BH3 son los más importantes en este tipo de interacciones. Se trata de potentes dominios de muerte celular pertenecientes a *Bax* que se pueden conjugar con BCL2 como una interacción proteína-proteína, formando dímeros. La célula en estado basal forma homodímeros de BCL2. Cuando se daña se empiezan a formar heterodímeros de BCL2-BAX y cuando este daño es irreparable se forman los homodímeros BAX que

permitirán la salida al citoplasma del citocromo C y el desencadenamiento de los procesos apoptóticos. Si hay demasiada proteína BCL2 se unirá a BAX, inhibiendo la desencadenación de la apoptosis.

- BCL2 junto con C-MYC, también inhibe el transporte de p53 desde el citoplasma al núcleo durante la fase G₀/G₁ del ciclo celular, periodo en que la célula sería susceptible de inducción a apoptosis dependiente de p53.

El producto normal de BCL2 se va a expresar durante el estadio madurativo de *pre-B cell*. La expresión de esta proteína se puede localizar en la membrana externa mitocondrial, en el retículo endoplasmático liso, y en la membrana perinuclear. . La desregulación de la expresión de BCL2 provocada por alguna anomalía hará que se exprese en los centros germinales, en células B maduras.⁴³

TRANSLOCACIÓN t(14;18)(q32;q21):

Citogenéticamente, la translocación t(14;18)(q32;q21) (*immunoglobulin heavy Chain/B-cell leukemia/lymphoma 2*) se encuentra presente en el 70%-80%^{17, 44} de LF (excepto para los Linfomas Foliculares IIIb)⁴⁵, en el 30% de los LBCG, en el 10-40% de Linfomas Hodgkin⁴⁶, esporádicamente aparece en el Linfoma de Burkitt^{47, 48} y en Leucemias Linfocíticas Crónicas. Se podría decir que está presente en el 25% de todos los linfomas de células B, aunque también se ha detectado en algunas hiperplasias foliculares⁴⁹.

Esta translocación afecta al gen de las cadenas pesadas de las *immunoglobulinas(IgH)* situada en el cromosoma 14, en el brazo largo(q) de la región 3, banda 2 y al gen de *BCL2* ubicado en el cromosoma 18, en el brazo largo(q) de la región 2, banda 1⁵⁰. (Fig 3).

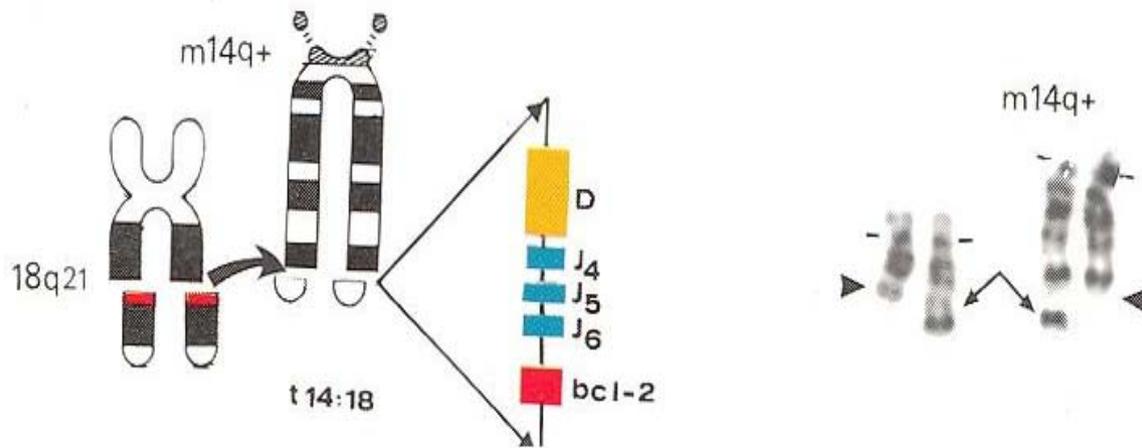


Fig 3. Representación cromosómica de la t(14;18).

Los puntos de rotura causantes de la translocación son variables, tanto en el gen de *BCL2* como en el de IgH.

El gen de *BCL2* va a presentar a partir del extremo 3' del exón 3 un conjunto de puntos de rotura que se extienden a lo largo de unas 30Kb (Fig 4).

La región más importante de rotura consta de 150 pb, localizadas en el extremo 3' del exón 3 y se denomina **MBR (Major Breakpoint region)**. Próxima a ésta, hebra abajo (en la región más distal del exón 3), se localiza la región de rotura **3'MBR**. Entre ambas regiones se localizan el 70% de las secuencias génicas donde se originan las translocación. (Fig 4)

Siguiendo la dirección 3', a unas 4.3 Kb de MBR, y ya fuera del exón 3, Buchonnet⁵¹ descubrió otro *cluster* adicional de rotura denominado **3'BCL2**. En esta región se encuentran entre el 5-10% de los puntos causantes de la translocación^{52, 53}. (Fig 4)

Siguiendo la misma dirección a una distancia de 14.6Kb de 3'BCL2, se localiza **ICR (intermedial cluster region⁵⁴)**. La frecuencia de las translocaciones que implican a estos puntos es todavía más baja que la de 3'BCL2. (Fig 4)

A 9.3 Kb hebra abajo de la región ICR, encontramos la región **mcr** (*minor cluster region*). Se trata de un cluster de unos 500bp donde se distribuyen los puntos de rotura con una frecuencia del 10-15%^{55, 56,57, 58}. (Fig 4)

A 1,8 Kb de mcr Buchonnet⁵¹ describió otra región de rotura que se denominó **5'mcr**, y cuya frecuencia ronda el 5%. (Fig 4)

Existe además otra región de rotura descrita; localizada en una región distinta, en el extremo 5' del primer exón del gen de *BCL2*, denominado **vcr** (*variant cluster region*) que tiene una mayor tendencia a sufrir reordenamiento con los *loci* que codifican para las cadenas ligeras de las *Igλ*⁵⁹, aunque también puede hacerlo con *IgH*. Incluso se han descrito linfomas foliculares con un doble reordenamiento de la región 3' y 5' de *BCL2* con inclusión en *locus IgH*^{39, 60}. (Fig 4)

En la actualidad se siguen descubriendo nuevos puntos de rotura localizados entre las regiones de *icr* y *mcr*⁶¹, que se caracterizan por sufrir un reordenamiento con *IgH*.

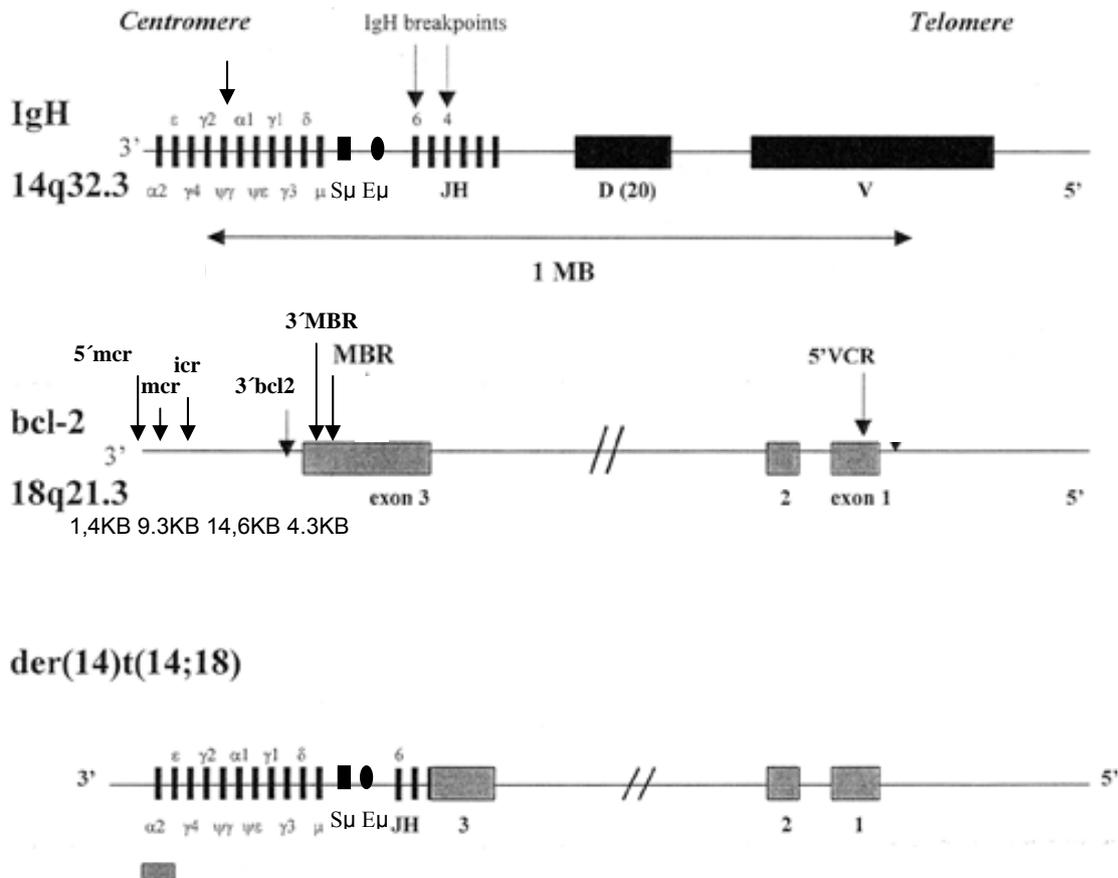


Fig 4. Puntos de rotura implicados en la $t(14;18)(q32;q21)$ ⁶².

Los puntos de rotura correspondientes al cromosoma 14 (Fig 4) se encuentran localizados en el área cercana a los miembros de la familia génica que codifican para JH entre los segmentos J y D. Generalmente se localizan en un cluster cerca del final J, en el cuarto o sexto segmento de JH^{56, 63, 64}, lugar de combinación con las regiones D por las secuencias SSR. Estos puntos se sitúan muy próximos a las regiones E μ de la Ig.

Otro punto de rotura descrito para IgH puede encontrarse en el extremo final 3' entre $\alpha 1$ y $\epsilon 2$ aunque este punto ha sido detectado en muy pocas ocasiones⁶³.

En un principio, el origen de la t(14;18)(q32;q21) se relacionó sólo a los estadios iniciales de maduración de los linfocitos B: *pre-B-cell*, al mismo tiempo que ocurría el reordenamiento de los segmentos D y J. Se produce como resultado de un error en la recombinación de estos segmentos⁵⁶ que, cuando se recombinan, lo hacen en dos cromosomas distintos, en vez de ensamblar los segmentos separados en el mismo cromosoma. Con el paso del tiempo se ha demostrado que la translocación puede ocurrir como un evento tardío durante el desarrollo de células B en el centro germinal³⁹.

La causa de que *IgH* recombine con el gen de *BCL2* puede ser motivada por que las regiones de MBR y mcr sean estructuras vulnerables y con capacidad de unión a otras proteínas, con elementos que pueden facilitar la recombinación homóloga. MBR y mcr contienen regiones polipurinas-polipiramidinas que potencian las conformaciones alternativas de ADN (ADN-Z o ADN-H) con secuencias repetitivas Alu (encontradas también para el punto de rotura de C-MYC) y octámeros de “*Chi-Like*” parecidas a las que recombinan *Escherichia Coli*^{65,56}. Además en la región polipurínica existe una secuencia rica en tetranucleótidos G muy similar a la encontrada en la clase S de la *IgH*.

Al suceder la translocación, el oncogén *BCL2* queda bajo el control de *IgH* E μ (región de expresión génica muy alta⁶⁶). (Fig 5)

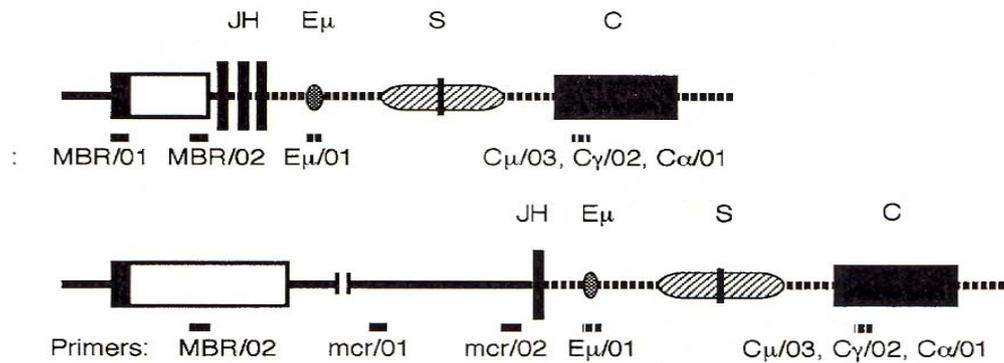


Fig 5. Posibles dimeros *IGH-BCL2* que se originan como resultado de la translocación.

El resultado del reordenamiento es una proteína de estructura normal, porque los puntos de rotura están localizados fuera de la región codificante (Fig 4). Lo que va a experimentar es una desregulación en la expresión del gen de *BCL2* con la consiguiente sobreexpresión proteica. Como *BCL-2* funciona como un factor de supervivencia celular protegiendo a las células frente a la apoptosis, provoca que los linfocitos portadores de la translocación *IgH-BCL2* no entren en apoptosis, teniendo una mayor supervivencia aunque con ello no se esté aumentando la proliferación de células B que desarrollan el LF. Otro dato a tener en cuenta es que la translocación por sí sola no va a originar la neoplasia.

Aunque la translocación característica por excelencia de los LF es la $t(14;18)(q32;q21)$, existen otras de menor frecuencia donde también se va a ver involucrado el gen de *BCL2*. Se trata de la $t(18;22)(q21,q11)$, una translocación que implica al gen de *BCL2* con la cadena ligera de las *IgL*, y la $t(2;18)(p11.q21)$ que implica a los genes de *BCL2* con *IgLκ*. Incluso hay descritos casos donde existe una translocación que implica a 3 genes $t(3;14;18)^{67}$.

1.2.3. GEN DE LA CICLINA D1. TRANSLOCACIÓN $t(11;14)(q13;q32)$.

CCND1 ó *BCL1* (*B-cell leukemia/lymphoma 1*) es un proto-oncogén también conocido como ciclina D1, D11S287E, PRAD1, U21B31. Se sitúa en el *locus BCL1*, 1 en el cromosoma 11, banda 1, subbanda 3.

El gen de la *ciclina D1* está constituido por 5 exones con un total de 13,37 Kb y codifica una proteína CCND1 que puede ser transcrita en dos isoformas, de 4,5 Kb y de 1.5 kb. Ambos transcritos contienen todas las regiones codificantes y difieren únicamente en el extremo 3' de la región no codificante. El ARNm de 4.5 Kb tiene en su extremo 3' una región AUUUA que disminuye la estabilidad de la CCND1, por lo que existirá una mayor expresión de proteínas en LCM de la isoforma 1.5 Kb⁶⁸.

La CCND1 interviene en la regulación del ciclo celular, durante la transición de la fase G1 a S. Altos niveles de CCND1 pueden traer como consecuencia el acelerar la transición de la fase G1 a S con la consiguiente proliferación de células tumorales. Esto se produce mediante dos mecanismos:

- La CCND1 se ensambla con el dominio catalítico de las quinasas dependientes de ciclinas 4 y 6 (CDK4 y CDK6). El resultado es la fosforilación e inactivación del Rb (retinoblastoma), inhibiendo su efecto represivo en la proliferación del ciclo celular⁶⁹.
- El complejo CCND1/CDK puede secuestrar a los inhibidores de CDK que son p27, kip1 y p21 y se encuentran por lo general unidos al complejo CDK2/ciclina E. Este, en estado libre de sus inhibidores va a fosforilar al Rb provocando una aceleración del ciclo celular.

Todos estos estudios sugieren que la sobreexpresión de CCND1 juega un papel importante en la patogénesis de los LCM. Ya que permite un mayor crecimiento de las células linfomatosas. Se produce una proliferación de las células incontroladas, un crecimiento anormal de los tejidos y como consecuencia la posible aparición del tumor.

TRANSLOCACIÓN t(11;14)(q13;q32):

Citogenéticamente la t(11;14)(q13;q32) es el resultado de la yuxtaposición del locus de *BCL-1* e *IgH*. Es altamente específica de linfomas de células de manto ya que se encuentra en el 95% de los casos. Aunque puede aparecer en otros linfomas pero en un porcentaje mucho más bajo, por ejemplo, en un 20% de las Leucemias Prolinfocíticas consideradas ya LCM en su fase leucémica, entre un 2 y 4% de los Mielomas Múltiples⁷⁰,

en el 1%⁷¹ de Linfomas de Linfocitos pequeño SLL y Leucemias Linfocíticas Crónicas (CLL), y muy raramente en linfomas esplénicos con linfocitos vellosos.

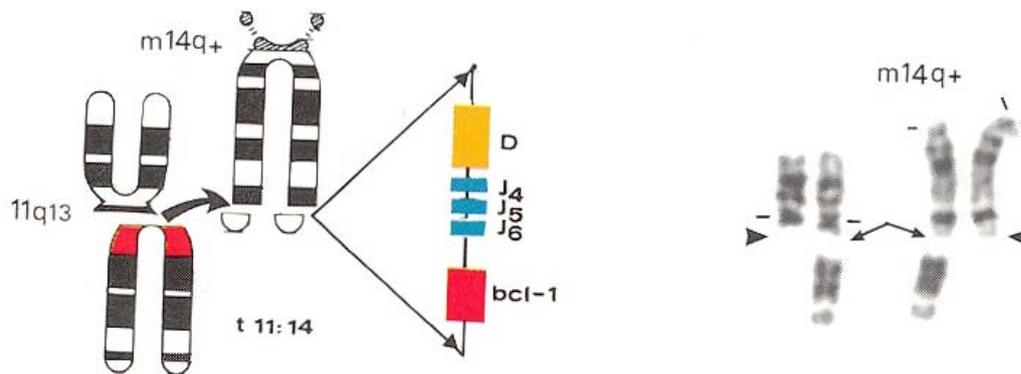


Fig 6. Representación cromosómica de la translocación t(11;14) (q13;q32)

La translocación suele ocurrir en los estadios iniciales de los linfocitos B “*naive-B-cell*” células B tempranas⁷². Los análisis de los puntos de rotura de J_H/BCL-1 han sugerido que esta translocación se genera como consecuencia de un error en el reordenamiento de D_H-J_H. Otros estudios han demostrado que la translocación también ocurre en etapas más maduras de los linfocitos B.⁷³

Esta translocación afecta al gen de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas (IgH) situada en el cromosoma 14, en el brazo largo(q) de la región 3, banda 2 en la región de unión J (*joining*) y se yuxtapone con el locus de *BCL1* en cuyo borde telomérico se encuentra el gen ciclina D1, situado en el cromosoma 11, en el brazo largo(q) de la región 1, banda 4⁷⁴, que va a codificar para la proteína ciclina D1 (Fig 6).

Los puntos de rotura para el locus de *BCL1* son muy variados y se encuentran dispersos a lo largo de 140 Kb del genoma. El principal se localiza en una región de más de 120 Kb hebra abajo⁷⁵ del gen *CCND1* y se conoce como “*major translocation cluster*” **MTC**, se corresponden con una región de 80pb causante del 40% de las translocaciones^{76,77, 78}. Se trata de una secuencia con características específicas que le van a permitir recombinar con segmentos de IgH, ya que tiene determinados motivos de heptámeros y

nanómeros, regiones de unión nucleadas y secuencias “*chi-like*” que permiten la recombinación.⁷³

Existen otras dos regiones a unas 22 Kb y 110 Kb hebra arriba de MTC respectivamente, donde se encontrarán otros dos *cluster* de rotura :“*minor tranlocation cluster*” **mTCs1**⁷⁹, donde la translocación surge con una menor frecuencia (15%) hacia el extremo telomérico, y la **mTCs2**⁸⁰.

En lugares todavía más distales a mTCS1 y mTCs se han encontrado otros puntos de rotura muy dispersos⁸¹.

Los puntos de rotura para el cromosoma para *IgH* se localizan generalmente en la región 5' de J_H.

Cuando se produce la t(11;14)(q13;q32) la expresión de BCL-1 queda bajo el control de *IgH Eμ* (región muy alta de expresión génica)⁷² (Fig 7). Esta yuxtaposición conduce a la desregulación de la proteína CCND1, con la subsiguiente sobreexpresión de CCND1 que juega un papel muy importante en el control del ciclo celular y no suele estar expresada a altos niveles en células B normales.

La t(11;14)(q13;q32) es considerada como el evento inicial oncogénico para el desarrollo de linfomas del manto, una vez la célula haya pasado por el centro germinal se manifiestan otras alteraciones cromosómicas y moleculares secundarias que van a interferir en el funcionamiento del ciclo celular. El conocimiento de estos mecanismos y su influencia en el comportamiento del tumor están facilitando el desarrollo de modelos pronósticos con una predicción más exacta de la evolución clínica de los pacientes⁸². El estudio con ratones transgénicos sugieren que la sobreexpresión de CCND1, aunque causa la desregulación en el ciclo celular no es suficiente por si sola para desarrollar por un fenotipo maligno^{20, 71, 83-85}.

Estudios recientes muestran que un 20-30% de LCM muestran hipermutaciones somáticas de los genes de las *Ig*, con una tendencia a la utilización del gen VH 4-34, un gen utilizado preferentemente por las células B involucradas en fenómenos autoinmunes, sugiriendo que estos tumores podrían originarse en poblaciones específicas de células autorreactivas B⁷².

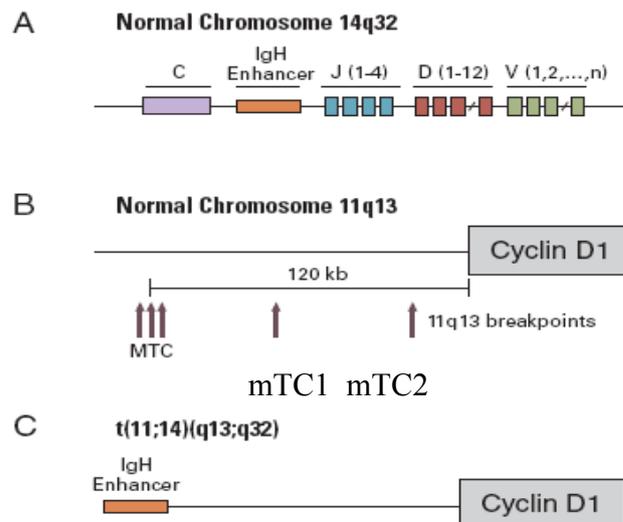


Fig 7. A: Locus para IgH. B: Locus de la CCND1. C: dímero originado como resultado de la t(11;14)(q13;q32)⁸¹.

1.2.4. GEN DE *BCL6*. ALTERACIONES CROMOSÓMICAS DEL 3q27.

BCL6 (*B-cell leukemia/lymphoma 6*) es un proto-oncogén, también designado como *BCL5*, *BCL6A*, *LAZ3*, *ZBTB27*, *ZNF51*. Se encuentra localizado en el brazo largo del cromosoma 3, región 2 banda 7.

El gen de *BCL6* está constituido por 10 exones con un total de 26Kb. La ATG señal para el inicio de la síntesis de la proteína se encuentra localizada en el exón 3.

El gen de *BCL6* codifica para una fosfoproteína nuclear de 92-98 KDa, que es un factor represor de la transcripción. La función de esta proteína es silenciar el funcionamiento de genes en células B y otras células del SI (sistema inmune).

La proteína *BCL6* tiene un C-terminal correspondiente con una estructura constituida por 6 dedos de zinc Cys₂-His₂ “*kruppel*” que se une a secuencias específicas del ADN⁸⁶, regulando la transcripción. El dominio N-terminal contiene un motivo conservado de interacción proteína-proteína; se trata de un dominio POZ cuya función es la homo⁸⁷ y heterodimerización de otras proteínas con dominios POZ que actúan como correpressoras tales como son NCoR, SMART y BcoR capaces de reclutar a deacetilasas dependientes de Histonas DAHC⁸⁸. Asimismo existe un dominio central con lugares

potencialmente fosforilables que puede unirse a mSINIIIa y POZ viéndose involucrado en la represión de la transcripción independientemente de su dominio POZ.

Esta estructura proteica de BCL6 permite la ejecución de la represión transcripcional sobre un gran número de genes, tales como *IL-4*, *BCR* y *CD40*, imprescindibles para el normal desarrollo de los linfocitos B. Además actúa sobre otros genes cuyas funciones vienen detalladas en la Tabla 3.

Blancos de BCL6	Expresión	Función relevante
Ig línea germinal ϵ	Activación de células B	Ig <i>switching</i> y producción
CD69	Activación de células B y T	Marcador temprano de B, T
CD44	Leucocitos	Dirigir y activar linfocitos
EB12	Linfocitos B	Activación inducida de linfocitos B
Id2	Ubiquitinación	Regulador negativo de diferenciación celular
Ciclina D2	Ubiquitinación	Control del ciclo celular
p27kip1	Ubiquitinación	Control del ciclo celular
STAT 1	Ubiquitinación	Señalización de citoquinas
Blimp-1	Plasma celular	Diferenciación de células B
B7-1	Activación de células B y dendríticas.	Activación y diferenciación de células B
IP-10	Macrófagos	Inducción IFN γ

Tabla 3. Funciones más representativas de BCL6 ³⁶

BCL6 se sintetiza solamente en etapas específicas del centro germinal, es decir está especialmente requerida para la formación del CG, no hay expresión de BCL6 en células B vírgenes ni en las que salen del CG los cuales derivan en procesos de apoptosis, células de memoria o células plasmáticas⁸⁹. Otro lugar donde se ha encontrado expresión de BCL6 son algunas células T, CD4+, y en una pequeña población perifolicular CD30+. En definitiva BCL6 es un marcador del paso celular por el CG ⁹⁰.

En ratones se ha evidenciado que la expresión de *BCL6* juega un papel regulador muy importante del desarrollo y funciones de los Linfocitos B⁹¹, quedando patente la contribución de *BCL6* a la linfomagénesis³⁶

ALTERACIONES CROMOSÓMICAS DEL 3q27.

Alteraciones estructurales de la región promotora del gen *BCL6*, bien sea por hipermutación somática de la región regulatoria 5' o alteraciones cromosómicas, representan la lesión más frecuente⁹² asociada a los LNH, afectando sobre todo a linfocitos B, especialmente a LBCG derivados del CG, LF, MCL, LB⁹³. El aumento de la expresión de *BCL-6* fuera del CG genera clonalidad de las células grandes B e impide la maduración de estas células.

La translocación cromosómica que afecta al gen de *BCL6* 3q27, aparece representada en el 8% de todos los LNH⁹⁴. La encontramos en un 5% de LCM, en el 15-38% de los LF y del 20-40% de los LBCG^{66,95}.

La translocación del gen de *BCL6* se origina entre dos grupos distintitos de genes clasificados como: Ig y No-IgH

Los genes de IgH con los que se puede reordenar *BCL6* son los 3 genes clásicos que van a codificar para el loci Ig originándose la $t(3;14)(q27;q32)(BCL6/IgH)$ ⁹⁶, la $t(2;3)(p12;q27)(IgL\kappa/BCL6)$ y la $t(3;22)(q27;q11)(BCL6/IgL\lambda)$ ⁹⁷.

A diferencia de de otros proto-oncogenes *BCL6* también puede reordenarse con un grupo heterogéneo de genes denominados No-Ig, los más representativos son *TTF*, *BOB-1*, *H4*, $t(3;4)$, $t(3;11)$, y $t(3;6)$, pero citogenéticamente se han identificados unos 20 genes con los que se puede translocar *BCL6*^{94,98}.

Los puntos de rotura para el gen de *BCL6* se localizan en su gran mayoría en una región de altamente conservada: **MMR (major mutation region)** o también conocido como MBR (Fig 8), se sitúan entre el primer exón no codificante donde se localizan los dos promotores: pA y pB y el extremo 5' del primer intrón⁹⁴. En la mayoría de los casos los puntos de rotura se encuentran localizados en el extremo 3' del primer exón, se ha visto que esta rotura es clásica en LBCG^{99,100}.

Existe otra región alternativa donde también se localizan otro conjunto de puntos de rotura, se trata de la región **ABR** (*alternative breakpoint region*) (Fig 8), situada a 245 y 285 pb en sentido 5' del primer exón de *BCL6*¹⁰¹ más relacionado a los LF^{12, 102}.

Los puntos de rotura para IgH son invariables y están en la región S "switch" siendo S γ la más afectada.

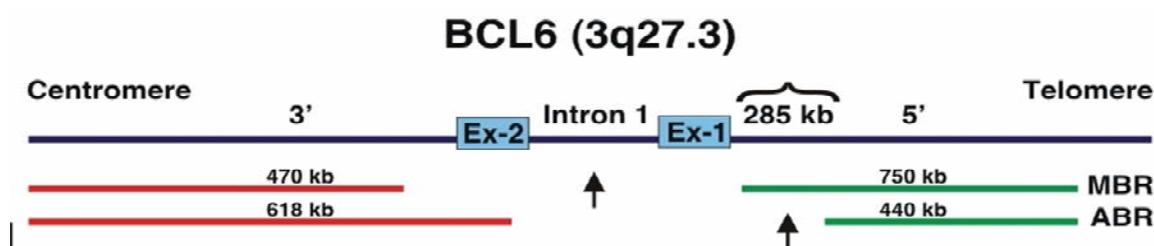


Fig 8. Representación esquemática de las localizaciones de los diferentes puntos de rotura para el gen de *BCL6*¹⁰³.

Los puntos de rotura para la *IgL* son variables e incluyen la región 5' de V₁J₁, el punto entre V₁2-1 y 3'V y segmentos entre J y C λ (Fig 9).

Cuando se origina la translocación la región codificante de *BCL6* va a permanecer intacta, quedando sólo sustituidas las secuencias reguladoras de la transcripción de *BCL6* por la secuencia heteróloga del cromosoma derivativo. El resultado de esta recombinación es la formación de un transcrito quimérico regulado por el promotor de la pareja con la que se haya recombinado. En el caso de la t(3;14) el gen de *BCL6* va a quedar bajo el control de los promotores E μ y I γ .

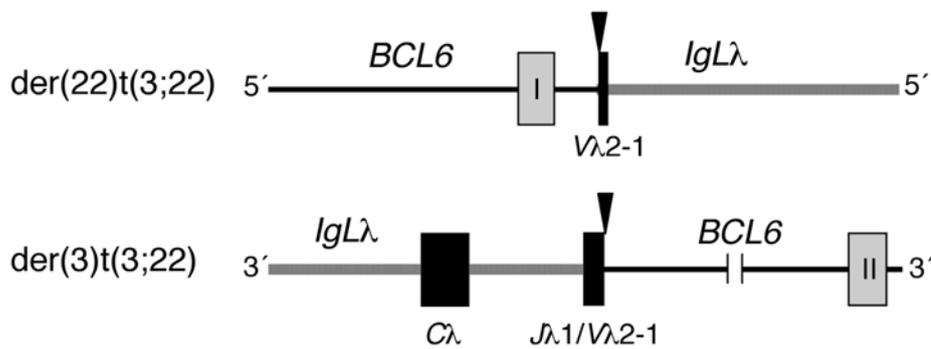


Fig 9. Dímeros originados tras la translocación de el gen BCL6 con las cadenas ligeras de las Igs⁹²

Cuando la translocación se origina con genes no-Ig es más difícil encontrar genes que aporten datos con propiedades comunes y explicar su relación con la sobreexpresión de BCL6. Lo que sí se conoce es que estas translocaciones producen un mayor crecimiento de las células neoplásicas frente a las normales. La fusión del gen se producirá en la misma orientación transcripcional, y los puntos de rotura de estos genes se localizan próximos a su secuencia promotora.

El reordenamiento de BCL6 es una alteración primaria, se cree que se origina cuando la Ig ya ha tenido contacto con el antígeno, en la etapa de conmutación de clases de la inmunoglobulina

Existe otro mecanismo por el que también se desregula la expresión de BCL6. Se trata de un fenómeno de hipermutación somática que ocurre a unos 730 pb del dominio MMC (*major mutation cluster*), en una región entre el primer intrón y exón que afecta no solo al gen de BCL6 en los LNH sino también a células B de individuos normales. Es decir, van a existir mutaciones somáticas en extremo 5' no codificante y en la región reguladora 5'; esto aparece independientemente de que exista translocaciones o su histología. Estas mutaciones de BCL6 han sido propuestas como marcador para saber si las células B han pasado por el CG ya que se han encontrado en LF y LBCG y están ausentes en leucemias linfoblásticas y LCM.

La propuesta de cómo la alteración de *BCL6* afecta a la homeostasis de células normales es por tres vías:

- Aumentando el crecimiento y proliferación celular.
- Previendo la muerte celular.
- Bloqueando la diferenciación terminal a célula plasmática¹⁰⁴.

1.2.5. GEN DE *MYC*. TRANSLOCACIÓN t(8;14)(q24;q32).

MYC (*myelocytomatosis viral oncogen homolog*) se trata de un proto-oncogén situado en el cromosoma 8, en el brazo largo banda 2.

Está presente en casi todas las células eucariotas y pertenece a los genes de respuesta precoz inmediata, genes que se activan rápidamente cuando las células en reposo reciben la señal que promueve la división.

Se encuentra constituido por 3 exones, en donde el primer exón no tiene la señal de inicio AUG. Según dónde se encuentre la pauta de lectura para la traducción de la proteína, bien en el exón 2 en su fragmento AUG o en la región no-AUG cerca del extremo 3' del exón 1, puede presentar dos isoformas variando en su N-terminal¹⁰⁵.

C-MYC es una fosfoproteína nucleares de transcripción, la forma de actuar es entrando en el núcleo y mediante señales de vías de traducción contactan con diferentes genes que responden a ellas. La proteína se une al ADN mediante secuencias específicas de aminoácidos llamados motivos hélice-giro-hélice, dedos de zinc y cremallera de leucina. Esta unión se puede producir en lugares específicos donde pueden activar o inhibir la transcripción de genes adyacentes. En el caso de C-MYC no se conocen del todo las bases moleculares de su función, pero sí que tras su traducción pasa rápidamente al núcleo, y forma un heterodímero con otra proteína llamada MAX. El heterodímero MYC-MAX se une a unas zonas específicas del ADN (llamadas zonas E) convirtiéndose en un potente activador. Max también se puede unir a otra proteína MAD que forman un heterodímero que inhibe la transcripción. De ello se puede deducir que el grado de activación de C-MYC no sólo depende de los niveles de proteínas MYC, sino también de la abundancia y disponibilidad de las proteínas MAX y MAD.

Sus funciones más características son

- Progresión del ciclo celular. Controla el paso de G_0 a G_1 en la proliferación celular. y tras un aumento transitorio del ARN del C-MYC la expresión vuelve a descender a sus valores iniciales.
- Apoptosis.
- Transformación celular.
- Funciona como factor de transcripción nuclear

La mutación sobreexpresión, reordenamiento y translocación de C-MYC ha sido relacionada con diversos tumores hematopoyéticos, especialmente con el linfoma de Burkitt¹⁰⁶.

TRANSLOCACIÓN t(8;14)(q24;q32).

La t(8;14)(q24;q32) translocación, y sus variantes t(2;8)(p12;q24) y t(8;22)(q24;q32), se detectan en el 80% de los linfoma de Burkitt (BL), pero también se han encontrado en un 15%, LBDCG⁵, en un 2% de LF y en otros NHL.¹⁰⁷

La t(8;14)(q24;q32) involucra al oncogén *MYC* que se yuxtapone con la cadena pesada de la *IgH*, en la translocación resulta alterada la expresión de *MYC* lo que va influir en el desarrollo de la neoplasia. Similarmente las variantes de esta translocación involucran al gen *MYC* con los genes de las cadenas ligeras *IgLκ* en 2p12, y *IgLλ* en 22q11.¹⁰⁸ (Fig10).

Los puntos de rotura para *C-MYC* son muy variados, uno de ellos se cree que está en el extremo 5' exón no codificante pero que se encuentra involucrado en la expresión del gen, mutaciones en este punto pueden ser responsables de la actividad transcripcional. Otro punto de rotura se localiza en el 3' *MYC*.

Asimismo *IgH* va a tener diferentes regiones recombinantes lo que sugiere diferentes modelos de activación del gen. Generalmente se ven involucrados en la translocación los segmentos VDJ. Aunque una de las primeras recombinaciones estudiada ha sido la región $S\mu$ "switch" de las *IgH* con la región 5' entre el primer intrón y primer exón.^{108, 109}

Pese a los diferentes puntos de rotura el dímero de fusión c-MYC-IGH que se origina en LB y en LBCG, es el mismo, compartiendo las mismas características clínicas aunque con una distribución diferente de edades.¹¹⁰

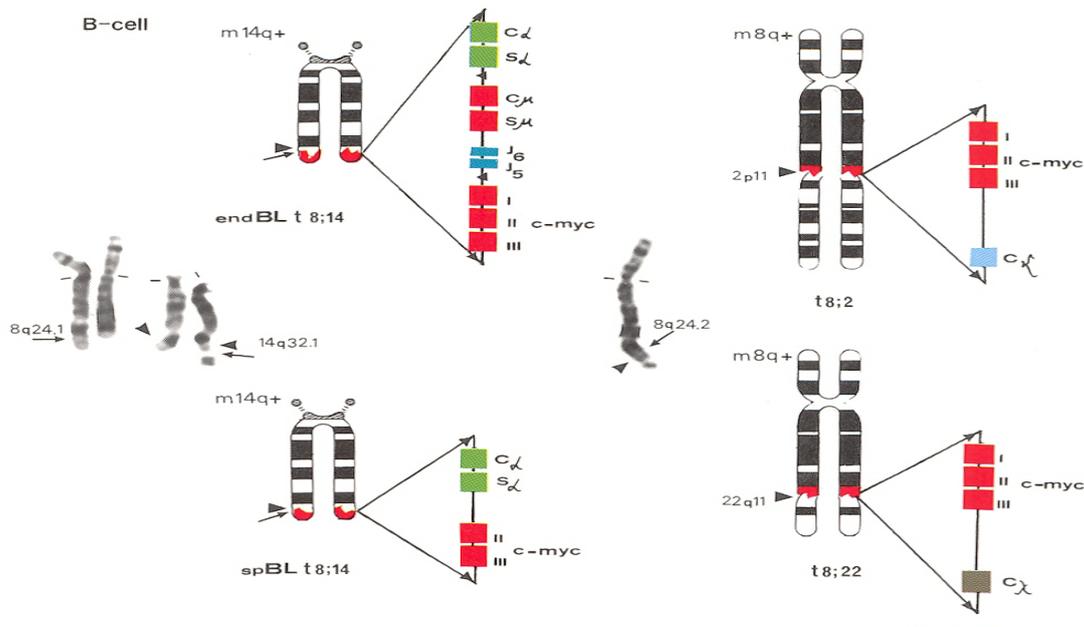


Fig 10. Representación cromosómica de las translocaciones t(8;14), t(8;22) y t(8;2).

Que haya puntos de rotura tan heterogéneos va implicar la existencia de varios mecanismos que produzcan la sobreexpresión de *MYC*. Estos todavía no se conocen con exactitud pero si las consecuencias de la translocación:

- Actividad transcripcional propiciada por la proximidad a secuencias E μ .
- Actividad transcripcional distanciada de las secuencias E μ ¹¹¹.
- Inactivación del extremo 5' regulador de las secuencia de *MYC*, provocada por la actividad mutacional de *IgH*.
- Alteración la vida media y cinética de la proteína *MYC*.

Cómo consecuencia de ello se produce una sobreexpresión de *MYC* que implica:

- Un aumento de la apoptosis.
- Promueve continuamente la proliferación de la célula y retarda la diferenciación¹¹².

1.3. DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE LOS LINFOMAS B.

Las técnicas moleculares nos van a permitir, en general, sondear la complejidad y variabilidad del contenido genético de un organismo.

En el estudio de los linfomas, las técnicas moleculares tienen un valor confirmativo de la hipótesis diagnóstica planteada en base al estudio histológico e inmunohistoquímico. En la mayoría de estas técnicas los resultados positivos ayudan a inclinar la balanza para un diagnóstico, sin embargo los resultados negativos tienen mucho menos valor, debido a las limitaciones del método.

En el momento actual las técnicas moleculares utilizadas para diagnóstico tienen dos objetivos:

- Detección de clonalidad.
- Detección de translocaciones.

1.3.1. DETECCIÓN DE CLONALIDAD.

La respuesta inmune adaptativa está mediada por los linfocitos B. Estas células son capaces de reconocer antígenos solubles y sintetizar anticuerpos específicos. Para ello se valen de una estructura de membrana, un agregado de proteína denominado receptor para el antígeno del linfocito B (complejo BCR) *B cell receptor*. La parte variable de este complejo BCR la constituye la molécula de inmunoglobulina (Ig) que es el componente implicado en la unión con el ligando (antígeno), por lo que las Igs son distintas en cada linfocito B³⁸ (gracias a que sus genes se reordenan como explicamos en el apartado 1.121)

De este modo, todos los linfocitos circulantes presentan una secuencia reordenada específica que da lugar a la gran variedad de receptores antigénicos. Sin embargo, en una

neoplasia linfoide, al proceder todas las células de una clona maligna, éstas presentarán el ADN reordenado de la misma forma.

El estudio del reordenamiento de los genes que codifican las cadenas pesadas de las Igs puede ser utilizado como detector en el estudio de clonalidad. Dichos genes se presentan en su configuración germinal como segmentos discontinuos de ADN tales como: regiones variables (V), de diversidad de unión (D), *joining* (J), y constantes (C).

Las regiones de variabilidad (V) de las IgH están formadas por tres regiones hipervariables denominadas regiones determinantes de complementariedad con el antígeno (*complementary determining regions* CDR1, CDR2 y CDR3). Las regiones CDR alternan con cuatro regiones relativamente invariables denominadas *Framework region* (FR1, FR2, FR3, FR4), blancos de las regiones de estudio^{113, 114}.

Existen varios métodos para estudio de clonalidad por técnicas moleculares.

Los primeros estudios fueron por *Southern-blot* (SB). Se trata de una técnica muy específica pero que presentaba ciertas limitaciones. A mediados de los 80 aparece PCR (*“polymerase chain reaction”*), y soluciona parte de los problemas de SB. Con esta técnica puede usarse muestras fijadas en formol o incluidas en parafina, es una técnica simple y rápida con una eficacia mayor que el SB y es indispensable para el análisis de clonalidad en los procesos linfoproliferativos. Se trata de obtener producto amplificado de la región de interés. Utilizando cebadores consenso de las secuencias más conservadas de las regiones V (FR3 y FR2) y J del gen de *IGH*¹¹⁵. Los cebadores deben flanquear los sitios de unión V-(D)-J, donde se genera a una gran heterogeneidad de tamaños si el ADN procede de una población policlonal, mientras que se obtendrá un único producto PCR dominante en células tumorales detectando clonalidad en un 30-70% de los linfomas B¹¹⁵, por lo que sigue siendo una técnica con limitaciones.

La visualización del producto de PCR se puede realizar mediante electroforesis en geles de acrilamida o electroforesis capilar. Lo que observaremos son múltiples bandas discretas en el caso de una población policlonal o una o dos bandas en el caso de una población monoclonal (Fig11C). Mediante electroforesis capilar observaremos múltiples picos con una distribución Gaussiana de pesos moleculares en el caso de poblaciones policlonales y uno o dos picos en las poblaciones monoclonales. (Fig 11B).

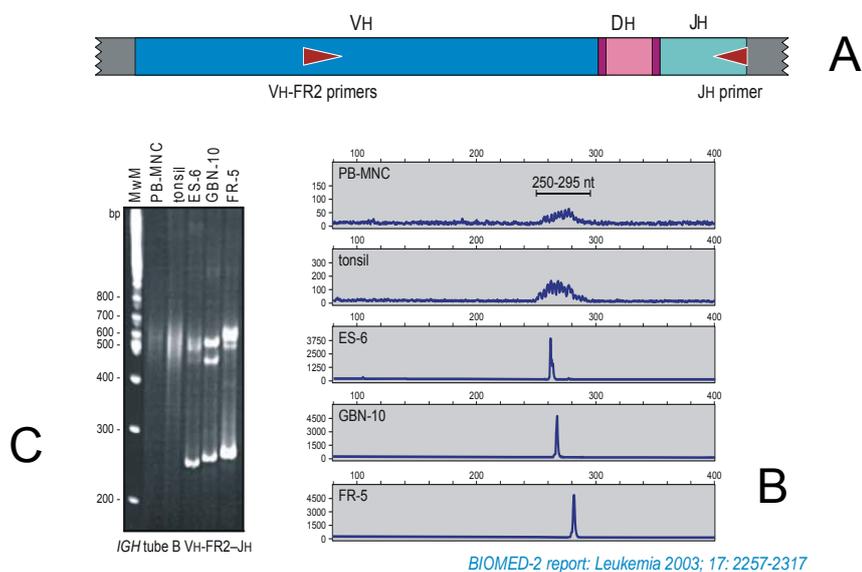


Fig 11. A. Interpretación esquemática de la unión de los cebadores con su secuencia diana en el DNA. B Visualización del producto de PCR para estudios de clonalidad en electroforesis capilar. Visualización del producto de PCR para estudios de clonalidad en geles de acrilamida¹¹⁵

Los resultados de estudios moleculares deben ser siempre interpretados en un apropiado contexto clínico y morfológico ya que la PCR es una técnica con limitaciones que puede dar:

“Falsos” positivos por estar detectando subclones seleccionados por una respuesta inmune exagerada en situaciones reactivas (infecciones por EBV (Epstein Barr), CMV(citomegalovirus), linfadenitis hiperinmunes,...) o por una técnica inadecuada (de PCR o de electroforesis), con excesiva sensibilidad o escasa capacidad de resolución.

“Falsos” negativos en el 30% de los procesos neoplásicos. La razón por la cual no se detecta clonalidad en la totalidad de caso son varias: presencia de mutaciones que impiden que los cebadores se unan al ADN, neoplasias que se originen en una célula progenitora muy inmadura en la que todavía no se ha producido el reordenamiento de los genes de las Igs, ADN no amplificable, inadecuado anillamiento de los cebadores, mutaciones somáticas o reordenamientos de IgVH en neoplasias post-foliculares, presencia de reordenamientos aberrantes, infidelidad de línea, neoplasias bilineales, ...).

Por eso encontrar un resultado negativo no quiere decir que no sea una neoplasia. Hay que tener en cuenta que clonalidad no equivale necesariamente a malignidad.

1.3.2. DETECCIÓN DE TRANSLOCACIONES.

A través de estudio citogenéticos se observó que en los linfomas de células B existían mutaciones estructurales características; se trataba de translocaciones específicas de cada subtipo de linfoma. La identificación de estas alteraciones citogenéticas en los desórdenes neoplásicos contribuyen a entender los mecanismos oncogénicos que sufren las células en su transformación, y son marcadores genéticos de la enfermedad⁵².

Se trata de alteraciones primarias caracterizadas por el paso de material genético de un cromosoma a otro. Por lo general son translocaciones recíprocas, donde los puntos de rotura suelen localizarse cerca de los telómeros de los cromosomas acrocéntricos, implicando una rotura en al menos dos cromosomas no homólogos, con intercambio de fragmentos. Cuando el intercambio recíproco se produce en fragmentos más o menos del mismo tamaño es muy difícil detectarlo por técnicas citogenéticas.

Estos errores suceden como consecuencia de fallos fisiológicos ocurridos durante los reordenamientos de los genes que codifican para receptores de antígenos, se trata Igs (*IgH*, κ , λ)⁶³ y se van a translocar recíprocamente con genes que presentan puntos de rotura variables, generalmente oncogenes, cuya expresión es desregulada por yuxtaposición con el gen receptor antígeno.

Para la determinación de las translocaciones, los laboratorios han empleado diversas estrategias, las de mayor éxito son: citogenética convencional que aunque tiene un bajo coste económico, aporta información sobre todos los cromosomas, tiene ciertas carencias ya que requiere células en división del clon neoplásico, presenta una interpretación dificultosa en caso de obtener cromosomas de mala calidad, permite el análisis de pocas células y tiene una baja sensibilidad, además es proceso largo que puede durar semanas. Por lo que su uso para detección exclusiva de translocaciones es poco recomendado. Como alternativa a la citogenética en la búsqueda de translocaciones surge la PCR que nos permite trabajar con núcleos en interfase y metafase, con material parafinado y es mucho más sensible. Esta técnica tampoco está exenta de problemas sobre

todo cuando los puntos de rotura son excesivamente amplios y variables, podemos obtener falsos negativos. En respuesta a estas carencias surge otra técnica, la FISH, como problemas podríamos decir que su coste económico es más elevado, y aunque en estudios genéticos sobre frotis de sangre periférica de leucemias su uso está muy extendido, presenta dificultades técnicas para su realización en cortes de tejido incluido en parafina¹¹⁶.

Por otro lado debemos tener muy presente que translocación no es siempre sinónimo de malignidad, resultados positivos deben ser interpretados con precaución y en su contexto clinicopatológico.

Dada la importancia del estudio de las translocaciones como información adicional para el diagnóstico de linfomas debemos desarrollar herramientas fiables, sencillas y poco exigentes en cuanto a las condiciones de conservación tisular, de forma que puedan realizarse estudios tanto prospectivos como retrospectivos.

Nuestro trabajo se centrará en el estudio de la eficacia de las técnicas de PCR y FISH para la clasificación de LF, LCM, LBCG en tejidos incluidos en parafina. Estos linfomas presentan alteraciones genéticas recurrentes muy características y por tanto de gran interés diagnóstico.

El material incluido en parafina es la forma más usual de conservación de los tejidos y representa la principal fuente de trabajo en los laboratorios anatomopatológicos, permitiendo realizar estudios retrospectivos. Un buen resultado va a depender en gran medida del procesamiento previo de la muestra. Cada fase en la secuencia de fijación, deshidratación, inclusión, corte, puede provocar artefactos (distorsiones de la arquitectura celular, por ejemplo arrugas).

El tipo de fijación previa a la inclusión en parafina, refiere una mención aparte, ya que un problema frecuente tanto en microscopía óptica, electrónica o de fluorescencia es la necesidad de evitar la degeneración autolítica y conservar la estructura celular. Para ello se recurre a fijadores como el formaldehído, glutaraldehído, B-5 (*Zenker-Formol*) que evitan la autólisis y putrefacción derivada de la muerte celular y tratan de conservar la arquitectura y composición tisular conforme se conservaba el organismo *in vivo*. En este caso, el fijador que vamos a usar es formol o formaldehído al 10%, ya que otros como el B-5 dificultan el éxito tanto las técnicas de PCR como de FISH.

Desde el punto de vista químico, el formaldehído en disolución acuosa se hidrata a radical metilenglicol. Esta sustancia tiende a formar enlaces con todos los grupos químicos, excepto con los de carácter ácido. Por este motivo tras la rotura de los puentes de hidrógeno intramoleculares forma puentes metílicos entre las moléculas proteicas adyacentes, de forma que los surgidos entre los grupos amino, imino, imido, guanidil, hidroxilo, carboxilo y sulfhidrilo son reversibles. Por el contrario, los que se forman entre aminoácidos aromáticos, como la tirosina, son indelebles. Estos puentes que detienen la degradación biológica y hacen que las células acepten mejor la tinción¹¹⁷, pero dificultan la accesibilidad de la sonda para unirse al ADN en el caso del FISH, o los cebadores en el caso de la PCR¹¹⁸.

Desde el punto de vista de la fijación, los artefactos más notables son desgarros y retracción que ocurre entre las diferentes partes del tejido al someterlo a la acción de un agente fijador. Por lo común estos cambios se relacionan sobre todo con la distinta proporción de agua que albergan los tejidos, y resultan potenciados por las notables diferencias que existen entre la presión osmótica del fijador y de los tejidos¹¹⁹.

El tiempo de fijación en formaldehído no debe superar las 24h si queremos disponer de un ADN celular en buenas condiciones para técnicas de biología molecular.

La inclusión en parafina es preferible realizarla con deshidratantes y líquidos intermediarios donde el punto crucial es la conservación de la temperatura por debajo del límite de 60°C, ya que elevaciones incluso transitorias, provocan inactivación génica.

1.3.2.1. Técnica de PCR.

Es una técnica molecular desarrollada por Mullis en 1983, mediante la cual podemos obtener copias in vitro de un fragmento de ADN o ARN de forma rápida y económica. En realidad lo que hace esta técnica es reproducir en un tubo de ensayo el fenómeno natural de replicación del ADN aunque en condiciones definidas para que tan sólo una precisa región del ADN sea duplicada por la enzima ADN polimerasa. Esta región es acotada por dos oligonucleotidos sintéticos, cebadores, que se aparean con las hebras monocatenarias de ADN una vez que la configuración de doble cadena se ha desnaturalizado por acción del calor. En presencia de abundantes deoxinucleótidos

trifosfatos y magnesio, la enzima ADN polimerasa sintetiza un nuevo filamento de ADN usando la molécula madre como molde y empezando por el extremo 3' del cebador hibridado. El proceso se sucede del siguiente modo:

- Desnaturalización térmica del ADN.
- Hibridación de cebadores específicos al ADN de cadena sencilla.
- Extensión enzimática (taq polimerasa) del ADN.

Si este proceso se repite un número (n) de veces, al final del proceso tendremos 2^n copias (amplicones) de la región delimitada por los cebadores.

La reacción de PCR admite la amplificación de ADN de diferente integridad y pureza. Ello hace que sea una técnica aplicable a ADN extraído de muestras clínicas de diversa naturaleza, tales como tejidos incluidos en parafina, citologías, sangres. No obstante, hay que tener en cuenta que el ADN de estas muestras se encuentra parcialmente degradado y que rara vez será útil amplificar fragmentos de más de 500 pb (pares de bases), recomendándose secuencias de tamaño en torno a los 200 pb.

El estudio de translocaciones mediante PCR se basa en la detección mediante amplificación de secuencias de ADN que, en condiciones normales no se hallan en continuidad. Ello se lleva a cabo utilizando cebadores diseñados para que se unan a ambos lados de los puntos de fusión de estas secuencias que la translocación ha fusionado. Lo hace mediante cebadores 5'-3' que reconocen una región del gen de interés y el otro 3'-5' que se unen con una región consenso de J-H.

Varias son las características principales que deben tener los cebadores para que aumente la especificidad, de forma que hibriden sólo con la secuencia de interés. Algunas de esta son:

- Longitud adecuada (si son muy cortos pueden ser complementarios a un mayor número de secuencias, por lo que el tamaño ideal es de 20 a 25 pb),
- Contenido CG: cebadores con mayor contenido C:G producen híbridos más estables, por lo que deben tener un contenido C:G en torno al 40-50%.

- Los extremos 3' de los cebadores no deben ser complementarios ya que se sintetizarían dímeros de cebador.
- La temperatura de anillamiento. Se ha demostrado que aumentos graduales en la temperatura de “*annealing*” de 55 a 67°C aumenta la especificidad de los productos de la PCR, eliminando secuencias inespecíficas y no teniendo que recurrir a la “*neested*” PCR que incrementa la posibilidad de contaminación.⁵⁸

1.3.2.2. Técnica de FISH: Definición. Etapas principales. Sondas.

Definición.

Es una técnica citogenética desarrollada en los años 80, basada en las técnicas de hibridación *in situ*, consiste en la detección de secuencias concretas de ácidos nucleicos (ADN o ARN)¹²⁰ mediante el empleo de sondas específicas marcadas radioactivamente o con sustancias no radiactivas, como en el caso de la FISH¹²¹ que no es más que una progresión de la metodología del HIS (Hibridación *in situ*) donde se sustituye los isótopos radiactivos por un fluorocromo.

Los dos componentes principales de la técnica de FISH convencional son:

- la sonda de ADN marcada con fluorescencia
- la secuencia diana en la muestra tumoral.

La FISH nos permite detectar secuencias específicas de ácidos nucleicos sobre cromosomas bien sea en la metafase cromosómica o en el núcleo en interfase. Permite trabajar en tejido en fresco, muestras congeladas, muestras citológicas o tejidos incluidos en parafina (preservando las características morfológicas de la muestra permitiendo una buena correlación con su morfología y la citogenética encontrada¹²²), lo que hace que esta técnica sea muy útil en estudios retrospectivos de tumores sólidos. Tiene alta sensibilidad y especificidad. Es una técnica rápida (24-48h) y pueden ser analizadas un gran número de células en poco tiempo.

Además la FISH no sólo se utilizará en el estudio de translocaciones sino que:

- Permite monitorizar el seguimiento de ciertas enfermedades como el cáncer de mama.
- Permite monitorizar el seguimiento de la terapia antitumoral, detección de recaídas y cuantificación de células genéticamente alteradas.
- Permite la detección de deleciones. Según la sonda empleada.
- Es muy útil para detectar alteraciones crípticas concretas o microdeleciones, no visibles en el cariotipo.
- Es de gran utilidad en investigación genética médica, determina la localización precisa de los puntos de rotura en tumores y detectar y localiza genes de interés conocido.

En sus comienzos se utilizó sólo como herramienta sólo en investigación, pero con el desarrollo de sondas marcadas con fluorocromos estandarizadas y los nuevos sistemas de visualización han hecho del FISH una herramienta válida y útil en la rutina diagnóstica.

Aunque presenta algunos inconvenientes tales como:

- No es una técnica de *screening* (se elige la sonda en función de la anomalía cromosómica que queramos detectar).
- No suele emplearse como técnica única sino complementaria al cariotipo, si este no resulta informativo.
- Elevado coste, tanto de las sondas como de los analizadores de imagen.
- Su utilización depende de la disponibilidad de las sondas de ADN.
- Debido a hibridaciones inespecíficas es necesario calcular en cada sonda la tasa de falsos positivos y falsos negativos. Puede existir ambigüedad a la hora de interpretar los resultados³⁷.
- No pueden ser detectadas muchas alteraciones simultáneamente.
- Con el tiempo pierde la fluorescencia, no permite su almacenamiento.

- El uso de material parafinado para la FISH presenta numerosos problemas técnicos.

Es importante destacar que no es una técnica de búsqueda de nuevas alteraciones cromosómicas, sino que detecta únicamente aquello que buscamos, el resto del genoma permanecerá oculto.

La clave del éxito de la FISH radica en usar un protocolo eficiente que exponga el blanco de los genes y permita la penetración de la sonda, pero simultáneamente que mantenga la morfología y la estabilidad de la célula¹²³.

Se trata de una técnica al igual que la PCR que mide una únicamente una alteración puntual con los cual no debemos basar un diagnóstico de un linfoma exclusivamente en la FISH.

Etapas principales.

Realización del corte: Esta es una etapa esencial. Las secciones se realizaran a 3µm. Es necesario que el corte sea homogéneo para que la técnica salga bien. Cortes demasiados finos podrían seccionar los núcleos¹²⁴. En las extensiones observamos la imagen en el microscopio de toda la célula, lo que hace que la detección de su señal sea inequívoca. En cortes parafinados dependerá del plano que haya sido cortada la célula y del grosor del mismo aunque es raro que abarque la totalidad de la célula (Fig 12).

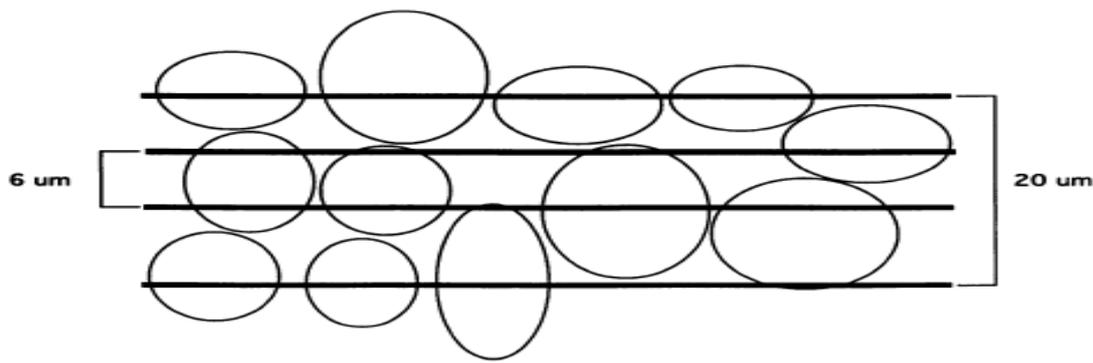


Fig 12. Posibles secciones celulares que podemos hacer con el microtomo¹²⁵

Fijación: lo que se hace es a través de fijadores es detener el metabolismo celular e inactivar enzimas lisosómicas como ARNasas endógenas, para conservar la morfología y la integridad de los ácido nucleicos. Fijadores como el formol actúan formando puentes de metileno entre los grupos amino del ADN o las proteínas. Esto ayuda a preservar la integridad del tejido pero reduce la penetración de las sondas. El tiempo de fijación afecta directamente al la hibridación y a la eficiencia de la fluorescencia³¹.

Pretratamiento: El objetivo de los pretratamientos es permitir la accesibilidad de la sonda al ácido nucleico diana. La asociación del ADN con las proteínas, reforzada por la fijación, dificulta el acceso de la sonda y es necesario un pretratamiento que “desenmascare” el ADN, mediante un agente químico y el color destruiremos estos puentes. Posteriormente, se eliminarán las proteínas y restos citoplasmáticos mediante una enzima proteolítica, posibilitando así, la accesibilidad de la sonda al ADN.

Desnaturalización: Consiste en la separación de las dos hebras del ADN. El aumento de temperatura debilita y rompe los enlaces covalentes (puentes de hidrógeno). La temperatura de desnaturalización variará dependiendo sobre todo del contenido de bases en G-C que son las que confieren una mayor estabilidad.

Hibridación. Es el paso en el que la sonda se une al ADN en base al grado de homología o complementariedad que presente con la secuencia diana. Se produce una renaturalización del ADN con su secuencia diana a una temperatura entre 37-45°C.

Lavados: Tienen como finalidad eliminar la hibridación inespecífica que produce fondo y enmascara la hibridación específica. Permite controlar la especificidad con la que

se va llevar a cabo la reacción. El rigor con el que se realiza la hibridación determina la fidelidad de la misma, o sea, el porcentaje de nucleótidos correctamente apareados para ello se atenderá a la temperatura y a la concentración iónica. La concentración de sal (Na^+) es inversamente proporcional a la estabilidad de los híbridos. Los lavados en concentraciones decrecientes de Na^+ entrañan la disociación de los híbridos según su estabilidad: los menos estables serán desnaturalizados antes que los híbridos más estables. Al aumentar la temperatura progresivamente sólo permanecerán unidos los híbridos que tienen un mayor grado de homología.

Detección: según el marcador empleado en este caso un fluorocromo se trata de una detección directa al microscopio óptico con los filtros añadidos.

La capacidad sistema óptico para mostrar detalles es como la del microscopio óptico. La resolución es de $0,2\mu\text{m}$, distancias superiores entre dos objetos que se encuentren separados entre sí se verán como uno sólo. La transmisión de electrones a través del haz del tejido produce una imagen de bidimensional del plano de corte, el estado de las células es en tridimensional con lo que bien podríamos estar dejando de ver alguna señal que quedara fuera de plano.

Sondas.

Una sonda, es una cadena de nucleótidos cuya contenido (o secuencia de bases nitrogenadas es conocida) y complementaria de la secuencia que se quiere detectar denominada “secuencia diana”. En los ensayos de FISH las sondas contienen genes de interés cuyo estado se va analizar en la muestra. La sonda reconoce y se une a la secuencia complementaria de ADN (*target*) presente en la muestra, de la misma forma específica que la descrita por Watson y Crick (a través de las bases nucleicas). Es decir, disponemos de sondas específicas para cromosomas individuales y para regiones cromosómicas, que permiten identificar reordenamientos particulares, u obtener un diagnóstico de la existencia de un número anormal de cromosomas.

Las sondas de FISH pueden estar marcadas directamente con fluorocromos que no necesitan anticuerpos para su detección (sondas directas) o con moléculas marcadoras que si necesitan anticuerpos para su detección (sondas indirectas). Se obtienen a partir de ADN

clonado de las regiones cromosómicas que queramos examinar¹²⁶ o mediante PCR y RT-PCR), y reciben el nombre de sondas convencionales; si se desarrollan por medio de una síntesis química de nucleótidos se denominan sondas sintéticas.

Las sondas convencionales, también llamadas sondas genómicas, comprenden:

- Sondas de ADN de doble hebra: se forman a partir de fragmentos de ADN clonados o por PCR. Su longitud es variable; de 100 pb a cientos de Kb. Tienen el inconveniente que precisan desnaturalización antes de la hibridación.
- Sondas de ARN o ribosondas: Sondas sintetizadas a partir de la transcripción de un fragmento de ADN previamente clonado. Son muy sensibles.

Las **sondas sintéticas** son en general más cortas que las anteriores y hay los siguientes tipos:

- Oligonucleótidos u oligos: sondas cortas de ADN monocatenario (15-30 pb). Su sensibilidad es menor debido al menor número de moléculas marcadas que pueden incorporar.
- Sondas PNA (*peptide nucleic acid*): Análogo sintético de un oligonucleótido, en el cual el esqueleto de las pentosas se reemplaza por una cadena peptídica, sobre la que se insertan los residuos de nucleósidos. Las sondas de PNA presentan mayor especificidad que las de ADN.

En general el estudio de las neoplasias se emplea diferentes **sondas sintéticas PNA** que según a la región del cromosoma que se unan distinguimos:

1. Sondas centroméricas.
2. Sondas de pintado cromosómico.
3. Sondas de locus específico.

1. Las sondas centroméricas: están formadas por secuencias repetitivas de ADN e hibridan en la región centromérica del cromosoma. Éstas, permiten detectar alteraciones cromosómicas de tipo numérico y valorar la ausencia o presencia de

alteraciones numéricas (monosomías, trisomías) tanto de núcleos metafásicos como interfásicos, sin la necesidad de tener células en división.

2. Las sondas de pintado cromosómico: están formadas por una batería de sondas que en su conjunto hibridan con todo el cromosoma. Permiten visualizar alteraciones citogenéticas tanto numéricas como estructurales, pero sólo lo hacen sobre metafases. Confirman de forma inequívoca cariotipos con translocaciones complejas o con cromosomas marcadores, esta técnica es de gran utilidad cuando los cromosomas son de mala calidad y la citogenética convencional, por si sola no puede resolver el cariotipo.

3. **Sondas de locus específico (LSI):** se conocen también con el nombre de sondas de secuencia única, hibridan con el ADN de una región genómica concreta, correspondiente a un gen o una banda cromosómica. Con ellas es posible detectar alteraciones numéricas y estructurales tanto en metafase como en interfase. Estas sondas son de gran utilidad para detectar alteraciones cromosómicas difíciles de identificar en las técnicas de bandeado convencional, como translocaciones crípticas o microdelecciones.

Según la estrategia empleada para la detección de translocaciones con sondas de locus específico se distinguen dos tipos de sondas:

IIIA: Sondas de fusión o de colocalización.

IIIB: Sondas de separación, “split” o “Break-Apart”.

IIIA: Sondas de fusión o colocalización: se basan en el empleo de una sonda específica para cada uno de los *loci* involucrados en la translocación, de tal manera que presentan dos fluorocromos, uno denominado *Spectrum Orange* que tiene un espectro de absorción de 559-560nm y emite a 588nm, es lo que vemos como color rojo, en un determinado par cromosómico, y el otro es *Spectrum Green* con un espectro de absorción a 497-509nm y emite a 538-524nm, es lo que vemos como color verde, en un par cromosómico distinto. La presencia de la translocación producirá una yuxtaposición de señales (roja y verde juntas o color amarillo si hay una gran superposición). Existen varios tipos:

3.A.a. Sondas Dual Color dual fusion.

3.A.b. Sondas Dual-Color Extra-Signal (ES).

3.A.c. Sondas Dual-Color Single Fusion.

3.A.a. Sondas “Dual color dual fusion”. Son las más utilizadas en el estudio de translocaciones en linfomas. Se trata de una mezcla de dos sondas para los dos genes implicados en la translocación, cada una de ellas marcadas con un fluorocromo distinto y diseñadas de tal modo que ambas se extienden a ambos lados del punto de rotura, de tal manera que veremos en un color (rojo) un determinado par cromosómico y en otro color distinto (verde) el cromosoma recíproco. El diseño de estas sondas disminuye el límite de detección de la técnica, al obviar resultados falsos positivos por colocación espacial de la señal (Fig13).

Con estas sondas, si la célula presenta un patrón normal veremos 2 señales rojas y dos señales verdes.

Cuando se produce la rotura y la translocación los fragmentos implicados se intercambian, apareciendo señales de fusión en ambos derivados. Los núcleos con translocación equilibrada presentarán una señal roja (cromosoma A normal), una señal verde (cromosoma B normal) y dos señales de fusión correspondientes a los dos derivados (roja y verde juntas o color amarillo si hay una gran superposición) (Fig 14).



Fig 13. (A) Célula con sondas dual fusion normal (B) Célula con sondas dual fusion translocada

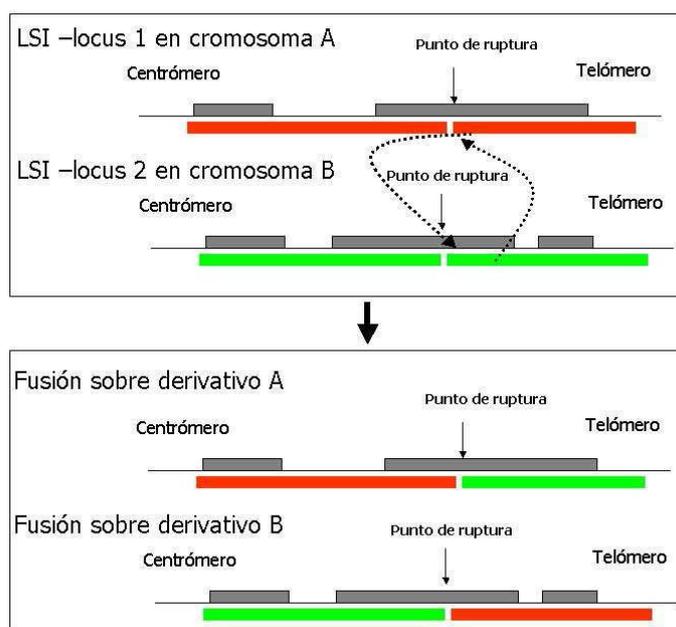


Fig 14. Representación esquemática de cómo hibridan las sondas *dual color dual fusion* con su secuencia blanco. El primer esquema se corresponde con el patrón de no translocación, y el segundo con el patrón translocado.

3.A.b. Sondas Dual-Color Extra-Signal (ES): Al igual que la anterior se trata de una mezcla de dos sondas para los dos genes implicados en la translocación, cada una de ellas marcadas un fluorocromo diferente. Pero en este caso están diseñadas de tal modo que una de ellas (la que se ve como una señal roja) se extiende a ambos lados del punto de rotura, mientras que la otra sonda (la verde) finaliza cerca del punto de rotura, sin atravesarlo. Cuando se produce la rotura y la translocación, los fragmentos implicados se intercambian y aparece una señal de fusión (der. B) más una señal extra roja (der. A) (Fig 15).

El patrón de normalidad es el mismo que el de las sondas anterior: dos señales rojas y dos señales verdes, correspondientes a las dos copias de cada uno de los loci implicados.

Al igual que en el caso anterior puede darse la colocación de las señales sin translocación.

Los núcleos con translocación equilibrada presentarán una señal roja (cromosoma A normal), una señal verde (cromosoma B normal), una señal de fusión correspondiente a uno de los derivados y una señal roja extra (Fig 15).

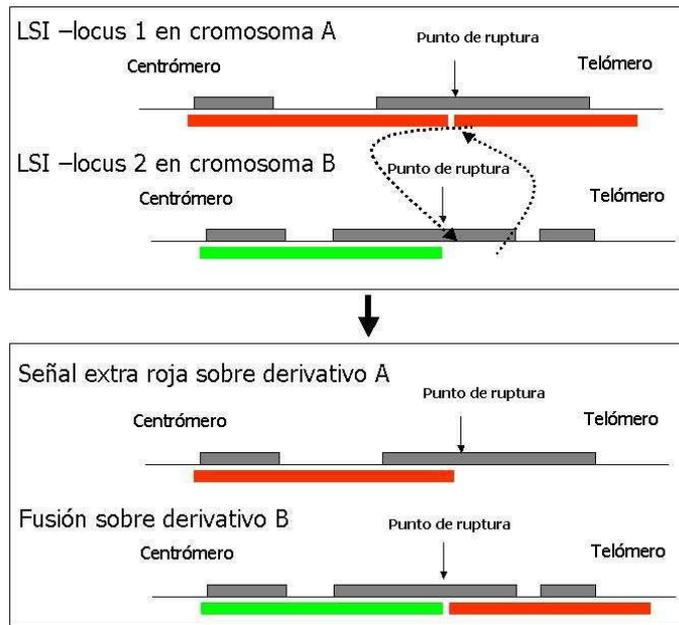


Fig 15. Representación esquemática de cómo hibridan las sondas *Dual-Color Extra-Signal* con su secuencia blanco. El primer esquema se corresponde con el patrón de no translocación, y el segundo con el patrón translocado.

3.A.c. Sondas “Dual-Color Single Fusion”: Se trata de una mezcla de dos sondas para los dos genes implicados en la translocación, cada una de ellas marcadas un fluorocromo diferente. Pero en este caso ambas sondas finalizan cerca del punto de rotura, pero sin atravesarlo. Cuando se produce la rotura y la translocación los fragmentos implicados se intercambian y aparece una señal de fusión (derivativo. B), sin dejar ninguna señal en el otro cromosoma derivativo A (Fig 16).

El patrón de normalidad: dos señales rojas y dos señales verdes, correspondientes a las dos copias de cada uno de los loci implicados.

Los núcleos con translocación equilibrada presentarán una señal roja (cromosoma A normal), una señal verde (cromosoma B normal) y una señal de fusión correspondiente a uno de los derivados. El otro cromosoma derivativo no presenta señal ninguna. (Fig 16)

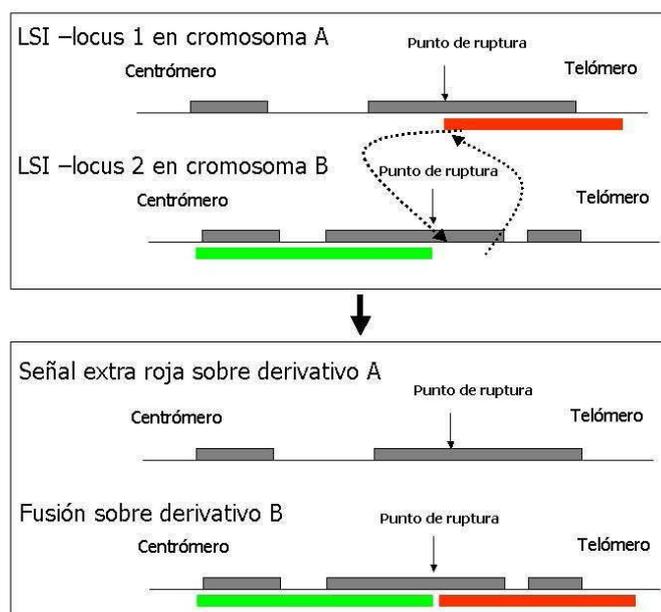


Fig 16. Representación esquemática de cómo hibridan las sondas *Dual-Color Single Fusion* con su secuencia blanco. El primer esquema se corresponde con el patrón de no translocación, y el segundo con el patrón translocado.

3.B: Las sondas de separación, “*Split o Break-Apart*”: Estas sondas han sido diseñadas para la detección de translocaciones de loci que pueden reordenarse con diversos cromosomas es decir son muy útiles para el estudio de translocaciones en los que los genes diana presentan múltiples posibles “*partners*” son muy promiscuos.(Fig18)

Van dirigidas contra regiones que flanquean el punto de rotura de modo que una de ellas se extiende desde el punto de rotura hacia el centrómero y la otra desde el punto de rotura hacia el telómero de un mismo gen. En este caso se trata de una mezcla de dos sondas cada una de ellas marcadas con un fluorocromo: uno denominado *Texas Red* que tiene un espectro de absorción de 595nm y emite a 620nm, es lo que vemos en color rojo, en un segmento del par cromosómico, y el otro es *FITIC* con un espectro de absorción a 595nm y emite a 620nm, es lo que vemos en color verde, en el otro segmento del mismo par cromosómico.

Por tanto, en el patrón de normalidad se ven dos señales yuxtapuestas. Cuando se produce la rotura y la translocación uno de los fragmentos implicados permanece en el

cromosoma derivativo A, mientras que el otro se separa. Así, los núcleos con translocación presentarán una señal roja correspondiente a un derivativo, una señal verde correspondiente al otro derivativo y una señal de fusión correspondiente al cromosoma normal (Fig 17).

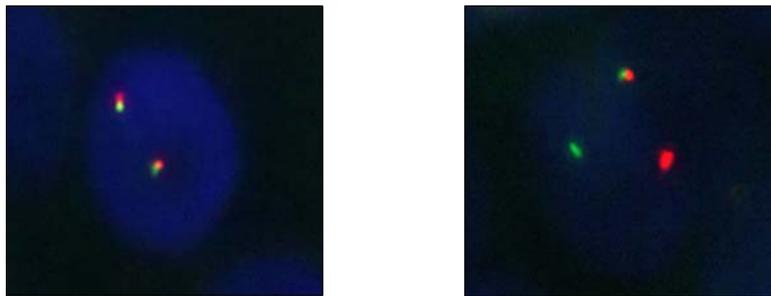


Fig 18. (A) célula con sondas split normal (B) célula con sondas split translocada

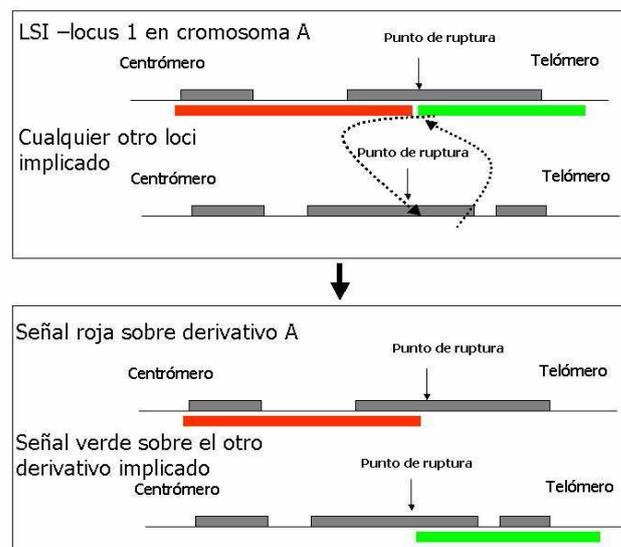


Fig 17. Representación esquemática de cómo hibridan las sondas “*Split o Break-Apart*” con su secuencia blanco. El primer esquema se corresponde con el patrón de no translocación, y el segundo con el patrón translocado.

Todas las sondas pueden ser sintetizadas y marcadas fácilmente, con una mezcla de oligonucleótidos frente a diferentes áreas de la secuencia diana para incrementar la sensibilidad. Las sondas de mayor tamaño formarán híbridos más estables permitiendo

detectar casi el 100% de los puntos de rotura. Sin embargo es recomendable para el estudio de las neoplasias el uso de sondas desarrolladas comercialmente que permiten estandarizar el método y poder trabajar de forma homogénea en todos los laboratorios.¹²⁷

2. Justificación y Objetivos

JUSTIFICACIÓN.

El diagnóstico y clasificación de los linfomas se encuentra en continua evolución desde hace 50 años. La clasificación de los linfomas ha sido siempre fuente de controversia debido a la gran heterogeneidad clínica y biológica que presentan. La aparición de técnicas moleculares ha supuesto un importante avance en la determinación de los distintos tipos LNH⁷. Definir las entidades clinicopatológicas, mediante por ejemplo, el estudio de determinados reordenamientos, nos ayudará a entender la patogénesis del tumor abriendo nuevas perspectivas para el pronóstico y tratamiento de los pacientes.

La asignación de una determinada alteración estructural con un tipo de linfoma se encuentra bien definida en la literatura¹²⁸. Los datos obtenidos mediante técnicas moleculares e integrados a los datos clínicos, morfológicos, inmunohistoquímicos, permitirán una asignación más precisa del diagnóstico diferencial de los LNH. Sin embargo, existe un punto controvertido en cuanto a la implicación pronóstica que representa la translocación. Esclarecer este punto puede ser decisivo para determinar la evolución del paciente y el tipo de tratamiento que se debe administrar^{129, 130}.

El análisis de las alteraciones genéticas se va a realizar mediante técnicas de FISH o PCR. Estas se ven limitadas cuando el material de trabajo es tejido incluido en parafina^{126, 127}, que por otra parte, es la fuente principal de trabajo en los laboratorios de Anatomía Patológica.

Una interpretación incorrecta de las biopsias en los procesos linfoproliferativos, puede ser el resultado de problemas técnicos o de interpretación en una de las fases del proceso diagnóstico¹³¹. Por ello, debemos disponer de herramientas fiables que nos ayuden a una correcta valoración. Definir una técnica apropiada de estudio y optimizar los parámetros será un punto clave en la obtención de resultados fiables. Nosotros valoraremos las técnicas más apropiadas para el estudio de translocaciones características de LNH B frecuentes.

OBJETIVOS.

1. Optimización de la técnica de FISH para la detección de las translocaciones más comunes en linfomas sobre muestras incluidas en parafina.
2. Comparar el rendimiento de la técnica de FISH con el de las técnicas de PCR para la detección de dichas translocaciones.
3. Establecer la frecuencia de dichas translocaciones en los tipos de linfomas estudiados.
4. Evaluar la posible asociación de dichas translocaciones con determinados rasgos de expresión inmunohistoquímica.
5. Investigar el valor del reordenamiento de *BCL2*, *BCL6* y *MYC* en relación con la presentación, evolución clínica y supervivencia de los LBCG.

3. Material y Métodos

3.1. MATERIAL.

En este trabajo se estudiaron 177 biopsias de material incluido en parafina:

- 64 LBCG.
- 59 LF.
- 30 LCM.

Como controles adicionales de técnica se emplearon: 9 Linfomas de Burkitt y 15 amígdalas reactivas.

Las muestras proceden del archivo de Anatomía Patológica del Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela, y se recogieron entre los periodos 1996 y 2008.

Se revisaron 60 historias Clínicas de los pacientes diagnosticados con LBCG, recogiendo los datos correspondientes a presentación clínica y evolución; en 4 casos no se pudo acceder a esta información.

3.2. MÉTODOS.

3.2.1. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS.

Fijación: 12-72 h. en formol tamponado al 10%.

Inclusión en parafina: deshidratación mediante pases en alcoholes de graduación creciente (70°C; 96°C, 96°C, 100°C, 100°C, xilol, xilol (líquido aclarante)). Poner la máquina “*tissue-Tek cryo console*” para 4 baños en parafina.

Enfriar el bloque en el congelador al menos durante 15 min.

Posteriormente realizar cortes con el microtomo (Leica RM2255).

Cortes a 4µm para realizar una hematoxilina-eosina de las muestras que nos interesan. Selección de la región tumoral.

- Cortes a 4 μ m para el estudio inmunohistoquímico. Posteriormente se estiran en agua destilada y se recogen en portas silanizados. Desecar las secciones a $\pm 55^{\circ}\text{C}$ toda la noche.
- Cortes a 3 μ m del tejido para estudio de translocaciones mediante la técnica FISH, igualmente las muestras se estiran previamente en agua destilada y se recogen en portas silanizados. Desecar las secciones a $\pm 55^{\circ}\text{C}$ toda la noche.
- Cortes a 14 μ m para la extracción de ADN, depositar en tubos *ependorf* en condiciones estériles para extracción y posterior estudio de PCR.

El *tissue array* se construyó a partir de 12 bloques independientes de parafina, donde a través de una hematoxilina buscábamos la región tumoral de interés que posteriormente seleccionábamos con *MTA-* (*Manual Tissue Arrayer Beecher Instruments, Sun Prairie, WI, USA*) con una aguja de 1.5 mm que luego introducíamos en otro bloque de parafina. Esta misma operación se repetía con todas las muestras, de tal manera que el diseño del bloque parafinado resultante era: 5 muestras puestas consecutivamente en la primera fila, 5 muestras en la segunda fila y dos muestras en la tercera fila. El mismo esquema lo pondríamos por duplicado en las siguientes filas. De modo que integramos en un mismo bloque parafinado 10 muestras tumorales y 2 controles (todo por duplicado).

3.2.2. TÉCNICA DE FISH.

Se realizaron cortes a 3 μ m del *tissue array*, 1 amígdala reactiva, 2 LBCG, 2 LF. Para la optimización de la técnica de FISH se sometieron las muestras a 5 soluciones de lavado distintas y en todas ellas se probaron diferentes temperaturas: según el siguiente protocolo:

3.2.2.1. Optimización de las soluciones y las temperaturas.

EDTA. Protocolo FISH	Tiocianato Sódico Protocolo FISH	Ác. Cítrico Protocolo FISH	Citrato Sódico. Protocolo FISH	Pretratamiento de DAKO. Protocolo FISH
Desparafinación (Xilol).....2 x 5'				
Rehidratación				
Etanol 100°.....2 x 3'				
Etanol 96°.....2 x 3'				
Solución de lavado.....2 x 3'				
EDTA 1mM Baño María 30' 80°C Microondas 10' 99°C y 15 TA ó Olla a presión 10' sobre 100°C	NaSCN 1Mm Baño María 30' 80°C ó Microondas 10' 99°C y 15 TA ó Olla a presión 10' sobre 100°C	Ac Cítrico 10mM Baño María 30' 80°C ó Microondas 10' 99°C y 15 TA ó Olla a presión 10' sobre 100°C	Citrato Sódico. Baño María 30' 80°C ó Microondas 10' 99°C y 15 TA ó Olla a presión 10' sobre 100°C	Pretratamiento de Dako Baño María 30' 80°C ó Microondas 10' 99°C y 15 TA ó Olla a presión 10' sobre 100°C
SSC2X → 2x5'				
Vaso con 50 mL con agua destilada +10mL HCL 37% +50 mL pepsina 0.01M				
SSC2X → 2x5'				
<i>OH 70°C</i>2'				
<i>OH 85°C</i>2'				
<i>OH 96°C</i>2'				
<i>secar TA</i>10'				
Echamos 3 µL <i>Sondas Split DAKO:BCL2</i> 85°C.....5' Incubar a 45°C toda la noche Lavar a 65°C con <i>stringent wash buffer</i> durante 10' Lavar 3' en solución de lavado. Deshidratar con etanoles.		Echamos 3 µL <i>Sondas Dual fusion VYSIS t(14;18)(q32;q21)</i> 72°C.....5' Incubar a 37°C las <i>Sondas Dual Fusion</i> toda la noche. Lavados: SSC 0.4X / 0.3% NP-40 73°C.....3' SSC 2X / 0.1% NP-40 TA.....1'		
Dejar secar 10'. Añadir 10µL de DAPI. Almacenar a 4°C durante 15' antes de ver la hibridación				

Tabla 4. Protocolos empleados para la realización de la técnica FISH.

Soluciones de trabajo.

- EDTA 1mM : Empleamos 50 mL, pH 8.
- NaSCN 1M: Empleamos 50 mL de NaSCN 1M.
- Ácido Cítrico 10mM: Empleamos 50 mL a pH 6.
- Citrato Sódico 1M: Empleamos 50 mL a pH 6.
- Pretratamiento de DAKO: Son pretratamientos comerciales que vienen concentrados al 20X, trabajaremos al 1X.
- SSC2X: Empleamos 50mL, pH 7 – 7,5.
- El uso de HCL 0.2M es recomendado porque puede actuar como agente desproteínizante incrementando la penetración de la sonda. 100 mL A-D + 2 mL HCl 37%.
- SSC 0.4X / NP-40 0.3% (pH 7 – 7,5): Empleamos 50mL. Preparamos una disolución para 500 mL, 50 mL de SSC20X en 400mL de agua destilada y añadir 1,5 µl de NP-40, ajusta a pH 7.5. Enrasar a 500 mL con agua destilada.
- SSC 2X / NP-40 0.1% (pH 7-7.5): Empleamos 50mL. Disolver para 500 mL, 50 mL de SSC20X en 400mL de agua destilada y añadir 5 µ de NP-40, ajusta a pH 7.5. Enrasar a 500 mL con agua destilada.

Material utilizado.

- Olla a presión *Duromatic Supreme*.
- Baño María BO2-2 200°C.
- Microondas *Whirpool JT359* tiene un sensor que cuando la temperatura baja o sube de lo requerido, la vuelve a ajustar.
- *Hybridizer Dakocytomation*: desnaturaliza el ADN e incuba toda la noche.
- Microscopio (*Olympus: DP70, Tokio, Japon*) para visualizar las muestras resultantes de la hibridación: equipado con un filtro para el DAPI y un filtro doble para

Texa-Red/FITIC espectro verde y naranja. Observamos las muestras con el objetivo de inmersión 100X. Con este microscopio trabajaremos tanto para ver y hacer fotos de FISH con la fluorescencia, como para ver con luz normal la inmunohistoquímica.

Las fotos fueron realizadas con los programas *DP-manager* que visualiza la imagen, *DP-controller* desde donde hacemos las fotos y ajustamos el color, y el *Adobe PhotoShop CS2* para fusionar los núcleos teñidos con el DAPI con la foto de los núcleos con las señales de hibridación.

3.2.2.2. Optimización de los tiempos de digestión.

Para monitorizar la digestión trabajamos con 5 LBCG. De cada una de las muestras se hicieron 4 cortes seriados a 3 micras.

Realizamos los pasos correspondientes al FISH tal y como aparece en la tabla 4, con el pretratamiento de NaSCN.

En el paso de la digestión enzimática, dejamos el primer corte de una misma preparación 5 min digiriéndolo en pepsina, el siguiente corte de la misma preparación estaba los 5 min (como el primero) y a mayores 3-5 minutos más en pepsina y así sucesivamente para las 4 preparaciones del mismo tejido.

Al parar la reacción en SSC2X, se deja secar la muestra, inmediatamente después se observa su morfología al microscopio.

Después se continúa con el proceso de hibridación. Para realizar el estudio utilizamos las Sondas LSI *Dual fusion de Vysis*, para las translocaciones: t(14;18)(q32;q21), t(11;14)(q13;q32), t(8;14)(q24;q32).

Posteriormente se realizó mediante este método el control de la digestión mediante la forma de helecho en un total de 36 casos correspondientes a:

- 8 LF correspondientes con dos bloques endoscópicos, tres quirúrgicos y tres autopsias.
- 4 LCM correspondientes con dos bloques endoscópico, dos quirúrgicos.

- 9 LBCG correspondientes a tres bloques endoscópico, tres quirúrgicos, tres autopsias.
- 9 LB correspondientes a tres bloques endoscópico, tres quirúrgico, tres autopsias.
- 6 amígdalas reactivas: correspondientes a tres bloques quirúrgicos y 3 autopsias.

Proteasas utilizadas:

Pepsina: Una solución *stock* con 5mL de glicerol, 5mL de agua y 0'1 gr de pepsina. Preparamos 10 mL de HCl al 0,01N y añadimos 50µl de la solución *stock*. Nuestra solución final de trabajo es pepsina sigma 0.5 mg/mL en solución de HCl 0.01N.

También se probó a digerir las muestras con otra pepsina comercial de Dako cuya concentración desconocemos, pero las muestras adquirirían la forma de helecho antes.

Otra proteasa con la que probamos fue Proteínasa K: Solución de Trabajo de Proteínasa K (50 µ/mL): Proteínasa K liofilizada 5 mg, añadimos 500 µL agua destilada. Cogemos 500 µL Solución Stock de Proteínasa K y ponemos en 10 mL TE (Tris 10mM, EDTA 1 mM, pH 8).

3.2.2.3. Comparación entre sondas: colocalización o separación.

La eficacia de las sondas de “*split*” (separación) o “*dual fusion*” (colocalización) fueron probadas en 4 LCM, 4 LF, 4LBCG y 4LB. Algunos de estos tejidos se corresponden con muestras antiguas donde la realización de la técnica FISH presenta mayores complicaciones.

Sondas de “Dual Fusion” de la casa comercial VYSIS:

- La sonda utilizada que detecta la t(14;18)(q32;q21) es la LSI *IGH/BCL2* *dual fusion* (Fig 20 y 21)

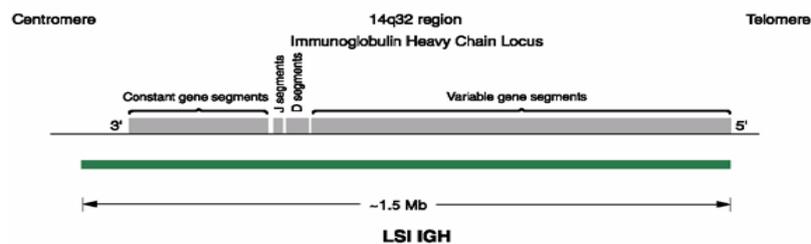


Fig 20. Sonda que hibridará con el cromosoma 14 para el locus de *IGH* abarcando una región de 1'5 Mb, que incluye casi el locus entero para *IGH* y 300 Kb más allá del extremo final 3'. Su espectro se verá en color verde. Esta será la empleada tanto para el estudio de la t(14;18)(q32;q21) como de la t(8;14)(q24; q32).

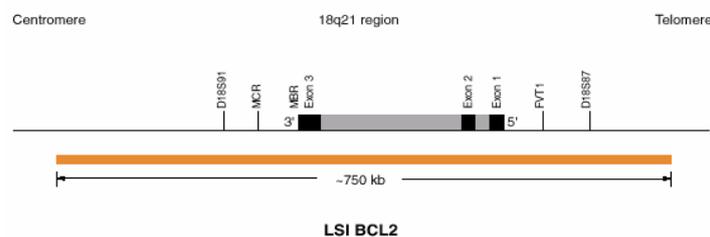


Fig 21. Sonda para el cromosoma 18 para el locus de *BCL2* abarca una región de 750Kb que va incluir la secuencia entera del gen *BCL2* y 250 Kb más del extremo distal y proximal de este gen. Su espectro se verá en color rojo.

- La sonda que detecta la $t(8;14)(q24;q32)$ es la LSI *IGH/MYC*, CEP8 tri-color *dual fusion*. (Fig 22)

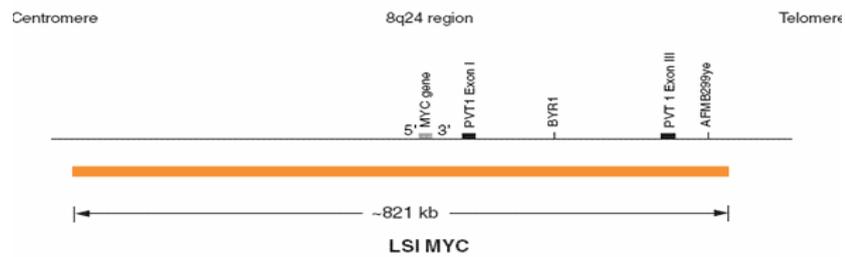


Fig 22. La sonda roja se va unir al cromosoma 8q24 en una región de 821Kb y emitiendo un espectro rojo y también se unirá al centrómero emitiendo un espectro aqua que queda enmascarado por el DAPI. La sonda que detecta el cromosoma 14 es la misma que la de la Fig 17.

- La sonda que detecta la $t(11;14)(q13;q32)$ es la LSI *IGH/CCND1* *dual fusion* (Fig 23).

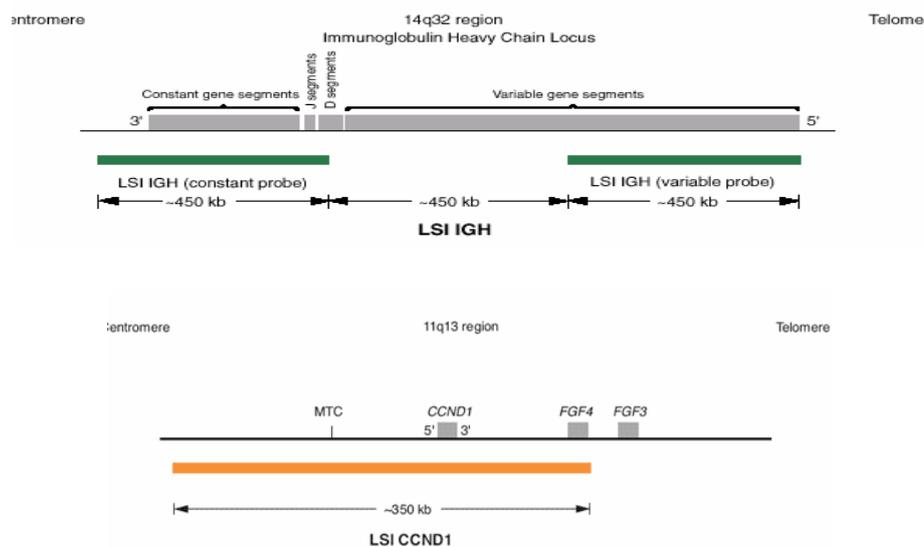


Fig 23. Las sondas marcarán en verde el locus de *IGH* flanqueado por dos regiones de 450 Kb y en rojo el gen de la *CCND1* y a lo largo de 350Kb.

Preparación de las *Sondas de Dual Fusion de VYSIS*:

7 μ L LSI/WCP *Hybridization Buffer* + 1 μ L de sonda.+ 2 μ L de agua ultrapura

Centrifugar la mix 3''-Vortex- Centrifugar 3''.

La interpretación para un núcleo de células normales será: dos señales rojas y dos señales verdes separadas.

Para una célula con la translocación veremos una señal roja, una verde separadas y dos señales fusionadas.

A veces puede que en lugar de ver una única señal roja o verde aislada aparezcan tres o cuatro señales procedentes de una única señal que se verán en un área muy cercana esto es debido al grado de condensación de los cromosomas. No estaríamos viendo una amplificación para que esto sucediera tendríamos que ver tres o cuatro señales en la mayoría de las células.

Adicionalmente puede que falte una señal roja en todas o casi todas las células sería el caso de una delección.

Sondas de *Split* casa comercial Dako:

Sondas de PNA que reconocen un único locus:

- *BCL2* FISH ADN *probe split DAKO*: reconoce cualquier translocación en la que este involucrada el locus de *BCL2*.(Fig 24)

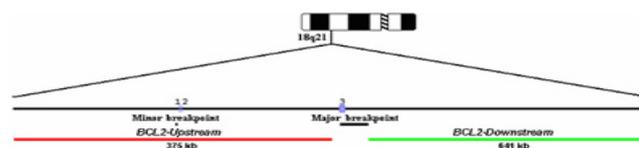


Fig 24. La sonda se va unir hebra arriba y hebra abajo entre los 3 exones del gen, quedando unida la sonda verde a un segmento de 641 Kb hacia la región telomérica, y la roja sobre un segmento de 375Kb hacia la región centromérica.

- *CCND1* FISH ADN *probe split* DAKO: está indicada para translocaciones donde participa el locus de *BCL1*. (Fig 25)

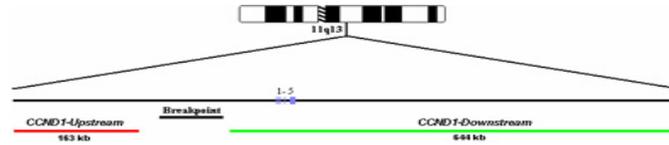


Fig 25. La sonda se va unir hebra arriba y hebra abajo entre los 5 exones del gen quedando unida la sonda verde a un segmento de 644 Kb hacia la región telomérica, y la roja sobre un segmento de 163Kb hacia la región centromérica.

- *MYC* FISH ADN *probe split* DAKO: está indicada para translocaciones donde participa el locus *MYC*. (Fig 26)

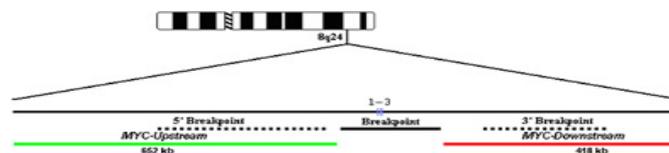


Fig 26. La sonda se va unir hebra arriba y hebra abajo a partir de los 3 exones que originan el gen, quedando unida la sonda roja a un segmento de 418Kb hacia la región telomérica, y la verde sobre un segmento de 652Kb hacia la región centromérica.

- **BCL6** MYC FISH ADN *probe split* DAKO: está indicada para translocaciones donde participa el locus *BCL6*.(Fig 27)

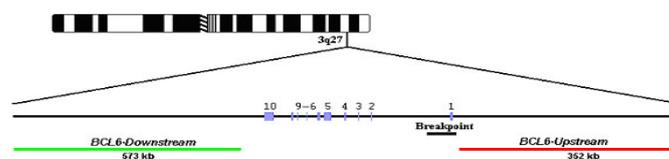


Fig 27. La sonda se va unir hebra arriba y hebra abajo a partir de los 10 exones que originan el gen, quedando unida la sonda roja a un segmento de 352Kb hacia la región telomérica, y la verde sobre un segmento de 573Kb hacia la región centromérica.

3.2.2.4. Niveles de corte.

Para cada una de las sondas (fusión y colocalización) establecimos los niveles de corte, "cut off" estudiando 15 amígdalas reactivas. Así comparábamos *split DAKO BCL2* frente a *Dual Fusion de Vysis IGH/BCL2*, *split DAKO CCND1* frente a *Dual Fusion de Vysis IGH/CCND1*; y *split C-MCY* frente a *Vysis IGH/MCY* en las 15 amígdalas indistintamente. Para cada una de las muestras analizadas se contaron 100 núcleos, anotando las separaciones encontradas para las sondas de separación, y las fusiones encontradas aunque sólo fuera una para las sondas de *dual fusion*. Los resultados los analizamos con el programa estadístico SPSS, según la fórmula estadística descrita por Haralambieva³⁷.

3.2.2.5. Aplicación de la técnica de FISH.

Analizamos 59 LF, 30 LCM, 64 LBCG, para estudiar las translocaciones mediante la técnica de FISH. Utilizando para el estudio LF las sondas Vysis que detecta la $t(14;18)(q32;q21)$ LSI/*IGH/BCL2*, las sonda de *BCL6 split DAKO*. Para el estudio de LCM la sonda de Vysis para $t(11;14)(q13;q32)$ LSI/*IGH/CCND1* y las sondas *BCL2*, *BCL6*, *MYC* sondas *split DAKO* en los LBCG.

3.2.3 TÉCNICA DE PCR.

Se procedió a la extracción de ADN de muestras parafinadas según el siguiente protocolo: *KIT PUREGENE; Gentra Systems*.

Poner 5-10mg de tejido en tubo de 1,5 ml. Cortes a 14 micras.

Desparafinación.

1. 500 µl de xilol. Incubar 5 min. con agitación suave.
2. Centrifugar a 24°C-14.000 rpm → 3 min → Ovillo → retirar xilol.
3. Repetir 2 veces. (3 lavados).
4. 500 µl de etanol (100%). Incubar 5 min. con agitación suave.

5. Centrifugar a 24°C-14.000 rpm → 3 min → Ovillo → retirar etanol.
6. Repetir 1 vez. (2 lavados).
7. Decantar y dejar secar.

Lisis celular.

1. 300 µl de solución de lisis. Homogenizar (golpecitos).
2. 3 µl de proteinasa K. Mezclar invirtiendo el tubo 25 veces e incubar a 55°C toda la noche (invirtiendo el tubo).

Tratamiento con RNAasa.

1. 1,5 µl de solución de RNasa.
2. Mezclar invirtiendo el tubo 25 veces e incubar a 37°C - 1 hora.

Precipitación de proteínas.

Enfriar muestra a temperatura ambiente.

1. 100 µl de solución de precipitación de proteínas.
2. Vórtex fuerte durante 20 seg.
3. Centrifugar a 24°C-14.000 rpm → 3 min → Ovillo.

Precipitación de ADN.

Enfriar muestra a temperatura ambiente.

1. Recoger sobrenadante (ADN) en tubo limpio de 1,5ml con 300 µl de isopropanol.
2. Invertir tubo 50 veces.
3. Centrifugar a 24°C-14.000 rpm-5 min.
4. Retirar sobrenadante y dejar secar el tubo sobre un papel absorbente limpio. Añadir 300 µl de etanol 70%; lavar el ovillo de ADN invirtiendo el tubo.

5. Centrifugar a 24°C-14.000 rpm-1 min. Retirar cuidadosamente el etanol para no perder pellet.

6. Invertir tubo y dejar secar sobre un papel absorbente limpio 10-15 min.

Hidratación de ADN.

1. Añadir 120 µl de solución de hidratación.
2. Incubar muestra -1 hora a 65°C- (o noche a temperatura ambiente).Golpear el tubo periódicamente.
3. Almacenar ADN a 4°C (mucho tiempo a -20°C ó -80°C).
4. Medir la concentración y pureza del ADN.

Estudio por PCR.

En el estudio de t(14;18)(q32;q21) preparamos por un lado un tubo *eppendorf* con los reactivos descritos a continuación para detectar MBR-JH y otro tubo *eppendorf* independiente para mcr-JH. Para un volumen total de reacción de 30 µL.

ADN: 250µg.

Buffer 10X: 5µL.

Mg⁺²: 1.25mM.

dNTPs: 0.13mM.

TaqPolimerasa: 2.5UI. (*Taq Platinum Invitrogene*)

MBR: 0.33µM 5'- GAGAGTTGCTTTACGTGGCCTG-3' (*forward*)¹³²

mcr: 0,33µM 5'-CGCTTGACTCCTTTACGTGCT-3' (*forward*)¹³²

JH: 0,33µM 5'ACCTGAGGAGACGGTGACC-3' (*reverse*)¹³³

En caso de la t(11;14)(q13;q32) utilizamos las mismas cantidades pero los cebadores eran distintos:

MTC: 0,33µM 5'-ATAAGGCTGCTGTACACATCGGTG-3' (*forward*)

mTCs: 0,33 μ M 5'-CTACTGAAGGACTTGTGGGTTGCT-3' (*forward*)

JH: 0,33 μ M 5'-GTGACCAGGGTNCCTTGGCCCCAG-3' (*reverse*)

Programa de PCR, desnaturalización previa a 95°C durante 5 min. A continuación n* ciclos con: desnaturalización a 94°C/1 min, hibridación 65°C/1min, elongación 72°C/30 seg.

* Para los cebadores MBR-JH fueron un total de 34 ciclos, mientras que los MTC-JH fueron 24 ciclos.

Se corren las muestras en geles de agarosa al 2% o de acrilamida-bis (19:1,40%).

3.2.4 TÉCNICA DE INMUNOHISTOQUÍMICA.

Analizamos 59 LF, 30 LCM, 64 LBCG de tejidos incluidos en parafina. Para el estudio de inmunohistoquímica utilizamos un agente desenmascarente T-E. La técnica se realizó con un inmunoteñidor automático (*Techmate, Dako*) y se utilizaron anticuerpos específicos primarios según lo que íbamos a detectar.

Para la detección se utilizó un *kit* con un segundo anticuerpo universal que usa un polímero de dextrano ligado a un conjugado-peroxidasa (Dako envision peroxidada/DAB; DAKO), con el fin de evitar los falsos positivos de la avidina endógena.

En la tabla se recogen las características y tratamientos de recuperación antigénica y la procedencia de los distintos anticuerpos comerciales que se han utilizado.

	CLON	DILUCION	PRETRATAMIENTO	PROCEDENCIA
BCL-2	124	1/20	Baño María-TE	Dako
Ciclina D1	SP4	Prediluido	Microndas T-E	Master Diagnostico
CD10	56C6	1/100	Microndas T-E	Dako
CD20	L26	1/5	Baño María T-E	Biosystems
BCL6	PG-B61	1/20	Baño María-TE	Dako

Tabla 5. Anticuerpos comerciales empleados.

3.2.5. ESTUDIO DE CORRELACIÓN CON LA EVOLUCIÓN CLÍNICA Y LA SUPERVIVENCIA.

Buscamos 64 pacientes diagnosticados entre el año 2003-2008 como LBCG (6 LBCG transformados de LF, 5 LBCG transformados de otros linfomas y 53 LBCG *de novo*), realizamos el estudio de los reordenamientos: *BCL2*, *BCL6*, *MCY* mediante técnicas de FISH en tejido parafinado con sondas *Split-Dako*. Comparamos la expresión proteica de *BCL2*, *BCL6*, *CCND1* con el reordenamiento. Analizamos las historias clínicas de 60 de estos pacientes (hubo 4 historias clínicas que no se encontraron) y rellenamos para cada paciente el siguiente cuestionario.

Pegatina al ingreso

NHC

LINFOMAS TRANSLOCACIONES
RESPUESTA AL TRATAMIENTO.

Datos generales del paciente	
Nombre y apellidos*	<input style="width: 95%;" type="text"/>
Fecha de nacimiento	<input style="width: 20px;" type="text"/> de <input style="width: 20px;" type="text"/> de <input style="width: 40px;" type="text"/>
Edad	<input style="width: 20px;" type="text"/>
Sexo	<input type="checkbox"/> hombre <input type="checkbox"/> mujer
Peso	<input style="width: 20px;" type="text"/> Kg
Número de biopsia	<input style="width: 40px;" type="text"/>

DATOS CLÍNICOS	
Fecha diagnóstico	<input style="width: 20px;" type="text"/> de <input style="width: 20px;" type="text"/> de <input style="width: 40px;" type="text"/>
Edad al diagnóstico	<input style="width: 20px;" type="text"/>
Diagnóstico	<input style="width: 95%;" type="text"/>
IPI	
Estadio	<input style="width: 95%;" type="text"/>
Edad al diagnóstico	<input style="width: 20px;" type="text"/>
Niveles LDH	<input style="width: 95%;" type="text"/>
Estado funcional ECOG	<input style="width: 20px;" type="text"/>
Número de localizaciones extraganglionares	<input style="width: 40px;" type="text"/>
Número de localizaciones ganglionares	<input style="width: 40px;" type="text"/>

TRATAMIENTO				
	No Especif si hubo(cirugia o raditp)	SI QUIMIO	Número de ciclos	Fecha de inicio. Fecha finalización
R-CHOP	<input style="width: 40px;" type="text"/>	<input style="width: 40px;" type="text"/>	<input style="width: 40px;" type="text"/>	<input style="width: 20px;" type="text"/> de <input style="width: 20px;" type="text"/> de <input style="width: 40px;" type="text"/> <input style="width: 20px;" type="text"/> de <input style="width: 20px;" type="text"/> de <input style="width: 40px;" type="text"/>
R- MEGACHOP	<input style="width: 40px;" type="text"/>	<input style="width: 40px;" type="text"/>	<input style="width: 40px;" type="text"/>	<input style="width: 20px;" type="text"/> de <input style="width: 20px;" type="text"/> de <input style="width: 40px;" type="text"/> <input style="width: 20px;" type="text"/> de <input style="width: 20px;" type="text"/> de <input style="width: 40px;" type="text"/>
OTROS	<input style="width: 40px;" type="text"/>	<input style="width: 40px;" type="text"/>	<input style="width: 40px;" type="text"/>	<input style="width: 20px;" type="text"/> de <input style="width: 20px;" type="text"/> de <input style="width: 40px;" type="text"/> <input style="width: 20px;" type="text"/> de <input style="width: 20px;" type="text"/> de <input style="width: 40px;" type="text"/>

RESPUESTA EL TRATAMIENTO			Fecha
1	REMISION COMPLETA	<input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> SI	<input style="width: 40px;" type="text"/>
2	REMISION PARTCIAL	<input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> SI	<input style="width: 40px;" type="text"/>
3	RECAIDA	<input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> SI	<input style="width: 40px;" type="text"/>

SITUACION ACTUAL		
<input type="checkbox"/>	Vivo sin enfermedad	
<input type="checkbox"/>	Vivo con enfermedad	
<input type="checkbox"/>	Pérdida del seguimiento	
<input type="checkbox"/>	Muerte por linfoma o tratamiento	Fecha <input style="width: 40px;" type="text"/>
<input type="checkbox"/>	Muerte por otras causas	Fecha <input style="width: 40px;" type="text"/>
En caso de remisión completa: Supervivencia libre de enfermedad (meses de remisión completa hasta recaída, fin de seguimiento o muerte)		
Supervivencia global (meses desde la fecha del diagnóstico hasta ultima revisión o muerte)		

Cuestionario de Linfomas, Translocaciones y Respuesta al Tratamiento empleado.

Los datos obtenidos se introdujeron en el SPSS 12.

Dividimos a los pacientes en dos grupos, según presentaban o no la translocación. Correlacionamos la presencia o ausencia del reordenamiento para los genes de *BCL2*, *MYC*, *BCL6*, con los factores clínicos de riesgo que definen a los LBCG. Identificando diferentes grupos de riesgo según el IPI (Índice de pronóstico Internacional) y asociándolos a estos reordenamientos.

Mediante el estadístico apropiado (generalmente Chi-cuadrado o el estadístico exacto de *Fisher*) con el programa SPSS.12 buscamos si existen diferencias significativas.

La supervivencia global OS (*Overall Survival*) era calculada desde el comienzo del diagnóstico de la enfermedad, definimos como evento la muerte del paciente por linfoma. Las curvas de supervivencia eran estimadas de acuerdo con el método de *Kaplan-Meier* y la diferencia entre las curvas se valoró con el *Test de Log-Rank*. El intervalo de confianza era calculado para el 95%.

4. Resultados

4.1. OPTIMIZACIÓN DE LA TÉCNICA FISH:

4.1.1. SOLUCIONES DE LAVADOS Y TEMPERATURAS

La temperatura es condicionante en la técnica de FISH. Las señales de hibridación más nítidas se obtienen a una temperatura de 99°C durante 10 min seguido de enfriamiento durante 15 min a T.A. (Fig 28).

El tipo de pretratamiento no influye en mejorar el rendimiento de la técnica de FISH, se obtienen señales de hibridación interpretables con todas las soluciones de lavado (Ác Cítrico, Citrato Sódico, NaSCN, EDTA, la solución de pretratamiento comercial *DAKO*). Aunque podemos decir que las señales mejor definidas las obtenemos con la solución comercial. (Tabla 6) (Fig 28)

El tipo de pretratamiento no es el causante de que exista un mayor desprendimiento de los tejidos en el *tissue array*, ya que éste no se produce durante el paso de las soluciones de lavado, sino en el paso previo de la rehidratación con alcoholes, por lo que es un problema de cómo el tejido se fija al cristal, y no de la solución de lavado empleada.

4.1.2. OPTIMIZACIÓN DE LOS TIEMPOS DE DIGESTIÓN.

Tiempos de digestión cortos o excesivos van a enmascarar la presencia de la señal. (Fig 29 y 30).

La mejor señal de hibridación se corresponde siempre con el tiempo de digestión en el que el tejido muestra la formación de una especie de “helecho” al microscopio óptico, independientemente de la sonda empleada (Fig 30). El control de la digestión mediante la forma de helecho es la forma más adecuada para monitorizar la digestión. Ya que los tiempos de digestión van ser siempre muy variables de unas muestras a otras dependiendo del tiempo de fijación y de la concentración de enzima que estemos utilizando.

Como regla general podemos decir que a igual concentración enzimática, las autopsias necesitan un mayor tiempo que las muestras quirúrgicas y estas que las endoscópicas (Tabla 7).

4.1.3. ELECCIÓN DE LA SONDA ADECUADA.

Para poder determinar un diagnóstico acertado es necesario buscar la interpretación visual más sencilla. Tanto las sondas de separación como las de colocalización ofrecen esta oportunidad en las 16 muestras analizadas, pero cuando existe mucha autofluorescencia de fondo bien por la antigüedad de la muestra o por el propio tejido, es mucho más gráfico tratar de localizar señales aisladas (muestras positivas con sondas de *split*) que buscar señales fusionadas (*sonda dual fusion*) que podrían proceder de la interacción de la señal de la sonda con la autofluorescencia de fondo.

En la Fig 31 A analizamos una muestra con mucha autofluorescencia de fondo, donde la señal positiva para *LSI/IGH/BCL2* “*Sondas Dual Fusion*” es difícil de interpretar, no se puede decir si hay señales de fusión ni dar un diagnóstico. En la Fig 31.B analizamos la misma muestra pero con las *Sondas “Split Dako”*, aunque la morfología celular no está definida, y existe mucha inespecificidad de fondo podemos interpretar señales, se observan señales separadas que se pueden interpretar como positivas para la translocación.

Las sondas de “*split*” ofrecen un patrón de interpretación mucho más claro.

4.1.4. NIVELES DE CORTE.

El resultado de analizar 15 amígdalas reactivas contando 100 núcleos y anotando las señales que encontramos positivas, se muestra en la Tabla 8. Se calcula la media de sus frecuencias positivas más 3 veces la desviación estándar, según Haralambieva³⁷.

Resultado: $8.533+11.1599 = 19.7\%$ de falsos positivos para las sondas de *dual fusion*.

Resultado: $3,800+6.23127 = 6.11\%$ de falsos positivos para las sondas de *split*.

4.2. LINFOMA FOLICULAR:

Estudiamos 59 LF de tejidos fijados en formol e incluidos en parafina. Correspondientes con 26 LF de grado I, 15 LF de grado II, 6 LF de grado IIIa, 9 LF de grado IIIb, 2 LF in situ y 1 LF en anillo de sello.

Los resultados obtenidos se reflejan en la Tabla 9 y se describen a continuación. (Fig 32)

4.2.1. DETECCIÓN DEL DÍMERO BCL2-IGH Y REORDENAMIENTO DE *BCL6* MEDIANTE FISH.

El estudio de la t(14;18)(q32;q21) mediante técnicas de FISH con sondas *dual fusion* resulta positivo en 39/59 LF analizados. Es decir el 66,1% de las muestras son positivas para el dímero BCL2-IGH. (Tabla 9).

El estudio del reordenamiento de *BCL6* mediante técnicas de FISH con sondas *split* resulta positivo en 7/59 LF analizados. Es decir el 11,9% de muestras son positivas para el reordenamiento de *BCL6*. (Tabla 9).

4.2.2. RELACIÓN ENTRE LA t(14;18)(q32;q21), REORDENAMIENTO DE *BCL6* Y GRADO HISTOLÓGICO EN LF.

Estudiamos 26 **LF grado I**. La incidencia para la presencia de la t(14;18)(q32;q21) es del 73% (19/26 muestras analizadas). Para el estudio del reordenamiento del gen de *BCL6* sólo hay una única muestra positiva (1/26), esta misma muestra también mostraba positividad para el reordenamiento de *BCL2* es lo que se denomina una translocación de *double-hit* (Tabla 9).

Estudiamos 15 **LF de grado II**. La incidencia para la presencia del dímero IGH-*BCL2* es del 73.3% (11/15 muestras analizadas). Para el reordenamiento del gen de *BCL6* sólo hay una única muestra positiva (1/15). Al igual que ocurre con la muestra del LFI esta muestra también es positiva para *BCL2*, se trata de una translocación *de double-hit* (Tabla 9).

Estudiamos 6 **LF grado IIIa**. La incidencia para la presencia de la t(14;18)(q32;q21) es del 16,6% (1/5 muestras analizadas). La incidencia para el reordenamiento de *BCL6* fue del 40%(2/5). Las 2 muestras positivas para *BCL6* resultaron negativas para la translocación que implica al gen de *BCL2* (Tabla 9).

Estudiamos 9 **LF grado IIIb**. La incidencia para la presencia del dímero IGH-*BCL2* es del 55,5% (5/9 muestras analizadas). La incidencia para el reordenamiento de

BCL6 fue del 33%(3/9), una de las muestras también resulta ser positiva para el reordenamiento de *BCL2* (*double-hit*) y las otras 2 son negativas para éste reordenamiento (Tabla 9).

Se estudian dos variantes del linfoma folicular, **dos LF in situ y uno en anillo de sello**. Las 3 muestras resultaron positivas para la alteración t(14;18)(q32;q21) y negativas para el reordenamiento de *BCL6* (Tabla 9).

4.2.3. ESTUDIO COMPARATIVO FISH-PCR PARA DETECCIÓN DE t(14;18)(q32;q21).

En el estudio de la t(14;18)(q32;q21) mediante técnicas de FISH con sondas *dual fusion* pudimos valorar 59/59 casos analizados (100%), y son positivas para este reordenamiento 39/59 casos. Mientras que para técnicas de PCR pudimos valorar 57/59 casos analizados (96,6%), y son positivas para el dímero JH-MBR 24/57 casos. En las muestras que son negativas para JH-MBR (33 casos) se analizó otro punto de rotura, la región mcr-JH, y encontramos positividad en 4/33 casos. Es decir que el total de muestras positivas obtenidas para el dímero de IGH-BCL2 por técnicas de PCR es 28/57 casos analizados (Tabla 10).

Si comparamos las muestras positivas para la t(14;18)(q32;q21) obtenidas por FISH y por PCR, obtenemos tal y como se muestra en la Tabla 10, un 26.3% más de muestras positivas mediante la técnica de FISH (hay que tener en cuenta que hay 2 muestras que no se pueden valorar por PCR por lo que no las comparamos). Esto demuestra que la técnica de FISH es más sensible para detectar la presencia de t(14;18)(q32;q21) frente a la técnica de PCR.

4.2.4. COMPARACIÓN ENTRE LAS TRANSLOCACIONES Y EXPRESIÓN PROTEICA DE BCL2 Y BCL6.

En el estudio de la expresión de BCL2 por métodos IHQ hemos encontrado positividad en el 89.8% de los casos (53/59), una positividad débil en el 8.5% (5/59) de los casos y negatividad en un 1.7% (1/59) (Tabla 11).

La translocación positiva y la expresión inmunohistoquímica positiva están presentes en 38 muestras. Mientras que hay 15/53(22,6%) casos que muestran expresión proteica por técnicas IHQ pero no se detecta presencia de la translocación por técnicas de FISH (Tabla 11).

En los casos diagnosticados con expresión de positividad débil, 4 muestras se corresponden con translocación negativa y 1 muestra con translocación positiva (Tabla 11).

En el único caso donde no hay expresión de BCL2 tampoco se encuentra la translocación.

4.3. LINFOMA DE CÉLULAS DEL MANTO.

4.3.1. DETECCIÓN DEL DÍMERO CCND1-IGH MEDIANTE FISH.

Estudiamos 30 casos diagnosticados como LCM para la t(11;14)(q13;q32) con sondas *dual fusion*. Los 30 muestras estudiados de LCM resultan positivas para la translocación, es decir 100% de positividad. Los resultados se reflejan en la Tabla 12. Fig 33.

4.3.2. ESTUDIO COMPARATIVO FISH-PCR PARA DETECCIÓN DE t(11;14)(q13;q32).

En el estudio de la t(11;14)(q13;q32) mediante técnicas FISH con sondas *dual fusion* pudimos valorar 30/30 casos analizados (100%), resultaron positivos 30/30 casos de LCM. (Tabla 12). Mientras que para técnicas de PCR pudimos valorar 29/30 casos analizados, y obtuvimos resultados positivos para el dímero JH-MTC en 18/29 casos. En las muestras negativas para JH-MTC (11 casos) se valora la región JH-mTCs donde no se encontró ninguna muestra positiva. (Tabla 13).

Lo que viene a significar que mientras por técnicas FISH obtuvimos positividad para un 100% de los casos, sólo un 60% resultaron positivos mediante PCR (Tabla 13).

Con la técnica de FISH obtenemos un 36,7% más de resultados positivos (hay que tener en cuenta que hay 1 muestra que no se puede valorar por PCR) (Tabla 13), lo que

convierte al FISH en una técnica más sensible para detectar la presencia de la translocación t(11;14)(q13;q32) frente a la técnica de PCR.

4.3.3. COMPARACIÓN ENTRE LA TRANSLOCACIÓN Y EXPRESIÓN PROTEICA DE CCND1

En el estudio de la expresión de CCND1 encontramos positividad en 29/30 casos (96.7%), y negatividad 1/3 (3,3%) casos.

Hay un caso que fue negativo por IHQ y sin embargo por FISH resultó tener el reordenamiento de la CCND1. (Tabla 12).

Mientras que por FISH obtuvimos un 100% (30/30) de reordenamientos para la CCND1, la expresión mediante técnicas IHQ es del 96,7% (29/30), lo que implica que por ambas técnicas se obtienen resultados similares.

4.4. LINFOMA B DIFUSO DE CÉLULAS GRANDES:

4.4.1. DETECCIÓN DE LOS REORDENAMIENTOS DE *BCL2*, *BCL6* Y *MYC*.

Los resultados de los 64 pacientes diagnosticados como LBCG, se corresponden a 53 LBCG *de Novo*, 6 LBCG transformados de LF y 5 LBCG transformados de LNH, vienen reflejados en la Tabla 14 (Fig 34).

Se estudiaron las siguientes alteraciones estructurales:

El estudio del reordenamiento de *BCL2* mediante sondas *split* es positivo en 13/64 (20.3%) LBCG analizados. De las muestras positivas 6 muestras se corresponden con los 6 LBCG transformados de LF 6/6 (100%) y las otras 7 proceden de los 53 LBCG *de Novo* 7/53 (13,2%)(Tabla 14).

El estudio del reordenamiento de *BCL6* mediante sondas *split* es positivo en 15/64 (23.4%) LBCG analizados. De los resultados positivos, 2 muestras se corresponden con LBCG transformados de LNH 2/5 (40%) y 13 muestras lo hacen con LBCG *de Novo* 13/53 (24,5%) (Tabla 14).

El estudio del reordenamiento de *MYC* mediante sondas *split* es positivo en 5/64 (7.8%) LBCG analizados. De los resultados positivos 1 muestra se corresponde con LBCG transformado de un LF que a su vez se presenta con el reordenamiento de *BCL2*, translocación de *double-hit*. Los otros 4 reordenamientos positivos para *MCY* se corresponden con LBCG de novo (4/53), una de estas muestras también presentaba una doble translocación con el reordenamiento de *BCL6* (Tabla 14).

En conclusión, 2/5 (40%) casos analizados para el reordenamiento de *MYC* se manifestaban con otra alteración, lo que indica que es frecuente que el reordenamiento de *MYC* ocurra como una lesión secundaria.

Resumiendo los datos de nuestro estudio podemos afirmar que alguno de estos tres reordenamientos están identificados en el 46,9% (39/54) de los LBCG de nuestra serie (Tabla 14). De las muestras positivas un 43,3% estaban representadas por el reordenamiento de *BCL2*, un 50% por el reordenamientos de *BCL6*, y un 16,6% se correspondían con el reordenamiento de *MYC*. El reordenamiento del *BCL6*, *BCL2* son los más comunes en LBCG.

4.4.2. COMPARACIÓN ENTRE EL REORDENAMIENTO Y EXPRESIÓN PROTEICA DE *BCL2* Y *BCL6*.

En el estudio de la expresión de *BCL2* por métodos IHQ encontramos positividad en el 83.8% (52/62) de los casos, negatividad en el 16,2% (9/62) y 3/64 (4,7%) muestras que no pudieron ser valoradas por técnicas IHQ. (Tabla 15).

Hay 12 casos que muestran translocación de *BCL2* positiva y presentan expresión proteica. Mientras que hay 40/52 (76,9%) casos que muestran expresión proteica por técnicas IHQ pero no se detecta la translocación por técnicas de FISH (Tabla 15).

Hay un caso que es negativo por IHQ y sin embargo por FISH resulta tener el reordenamiento de *BCL2*.

En el estudio de la expresión de *BCL6* por métodos IHQ encontramos positividad en 44/59 (81,4%) y positividad focal en 7/59 (11.8%), negatividad en 8/59 (13,5%) y hay 5/64 (7,8%) muestras que no pueden ser valoradas. (Tabla 16).

Encontramos 11 casos que muestran expresión proteica y translocación positiva. Mientras que hay 33 casos que muestran expresión de BCL6 por técnicas IHQ pero no se detecta la translocación por técnicas FISH (Tabla 16). En cuanto a las muestras diagnosticadas con positividad focal 5 de ellas no presentan el reordenamiento de BCL6 por técnicas de FISH y dos muestras sí la presentan. Si consideramos como positivas las muestras focales podemos afirmar que por técnicas IHQ encontramos 74,5% (38/51) de muestras con expresión de BCL6 y reordenamiento negativo de *BCL6* por FISH.

4.4.3 IMPLICACIÓN DE LAS ALTERACIONES GENÉTICAS EN EL PRONÓSTICO Y LA SUPERVIVENCIA.

Comparamos el reordenamiento de *BCL2*, *BCL6* y *MYC* con los siguientes parámetros:

Sexo, edad, localización, estadio, ECOG, LDH, número de localizaciones ganglionares, número de localizaciones extraganglionares, infiltración de médula ósea, IPI, y respuesta al tratamiento. No hay ninguna asociación estadísticamente significativa entre estos parámetros y los reordenamientos, por lo que no existe una implicación del reordenamiento de *BCL2*, *BCL6* ó *MYC* y el impacto pronóstico. Tan sólo hay una asociación estadísticamente significativa ($p < 0,005$) entre el reordenamiento de *BCL2* y el estadio (Tablas 17, 20, 23).

Supervivencia

La prueba de igualdad de distribuciones de supervivencia mediante el estadístico de contraste *Log Rank* (Manrel-Cox) muestran los siguientes niveles de significación:

- Para el reordenamiento de BCL2, BCL6 y MYC y supervivencia: $p=0,557$, $p= 0,581$, $p= 0,387$, respectivamente.
- Para los 3 reordenamientos y la supervivencia $p= 0,518$.
- Para la sobreexpresión de BCL2 y BCL6 y supervivencia $p= 0,762$ y $p= 0,037$ respectivamente.

No hay diferencias estadísticamente significativas entre los reordenamientos de *BCL2*, *BCL6* y *MYC* y el tiempo libre de supervivencia. (Tabla 18, Tabla 21, Tabla 24).

No hay diferencias estadísticamente significativas entre el conjunto de los 3 reordenamientos y el tiempo libre de supervivencia. (Tabla 25).

No hay diferencias estadísticamente significativas entre la sobreexpresión de *BCL2*, y el tiempo libre de supervivencia (Tabla 19).

Si existen diferencias estadísticamente significativas entre la sobreexpresión de *BCL6* y el tiempo de supervivencia ($p < 0,005$). Las formas que presentaban sobreexpresión de *BCL6* tienen una supervivencia global mayor.

4. 5. FIGURAS.

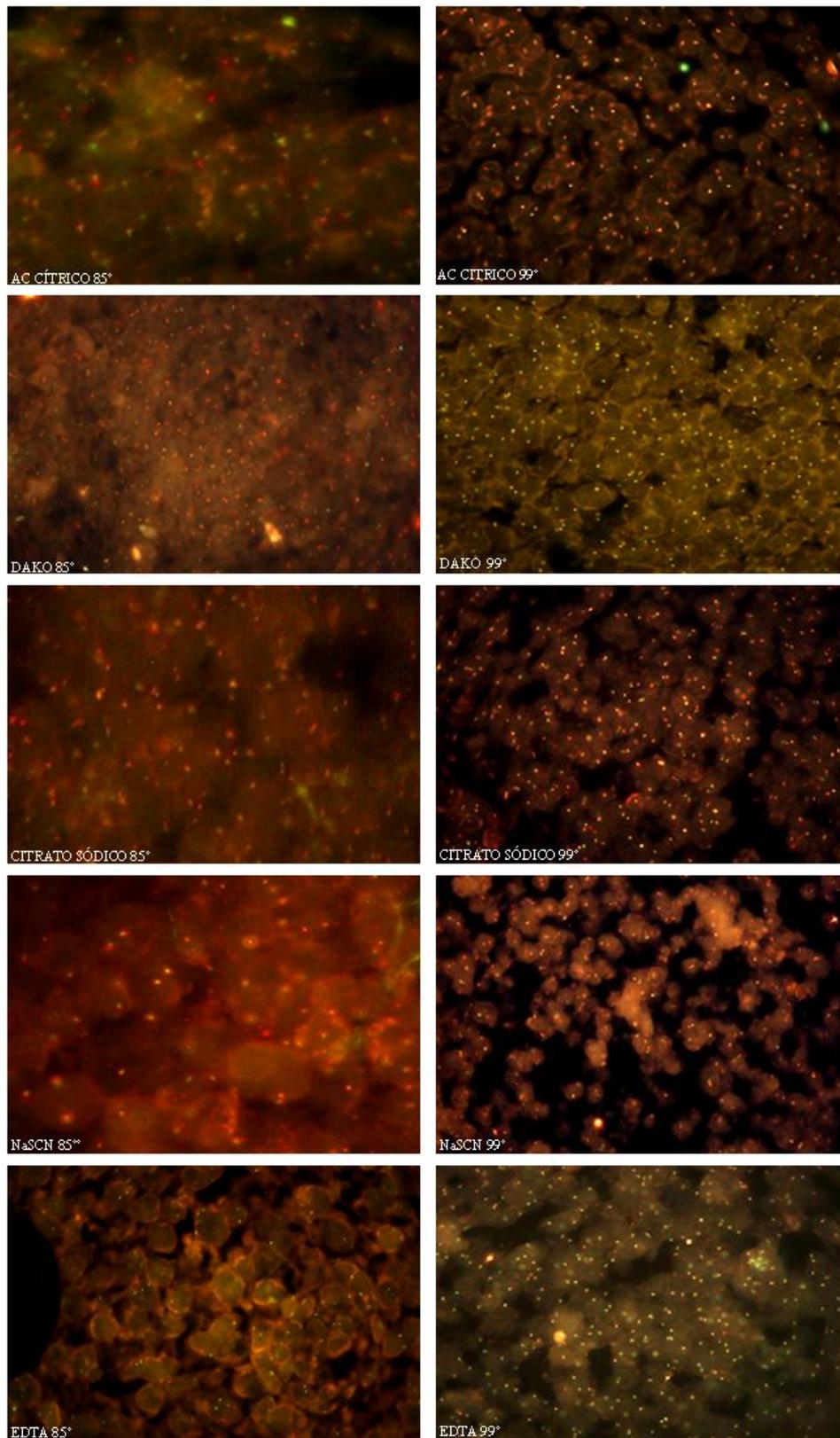


Fig 28. Diferentes pretratamientos a 85°C durante 30 min ó 99°C durante 10 min y 15 min a temperatura ambiente. Dako split signal *BCL2* FISH ADN probe.

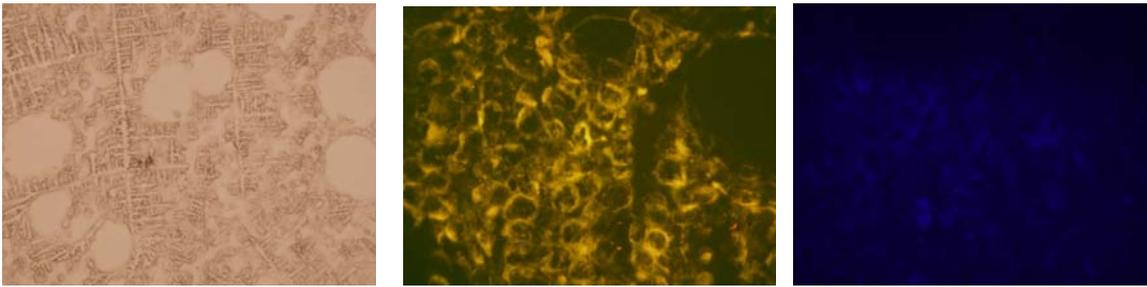


Fig 29. Tiempos de digestión excesivos. A) Imágenes de tejido sobredigerido, B) fluorescencia sobredigerida, no se obtiene señal de hibridación C) DAPI sobredigerido, núcleos fantasmas.

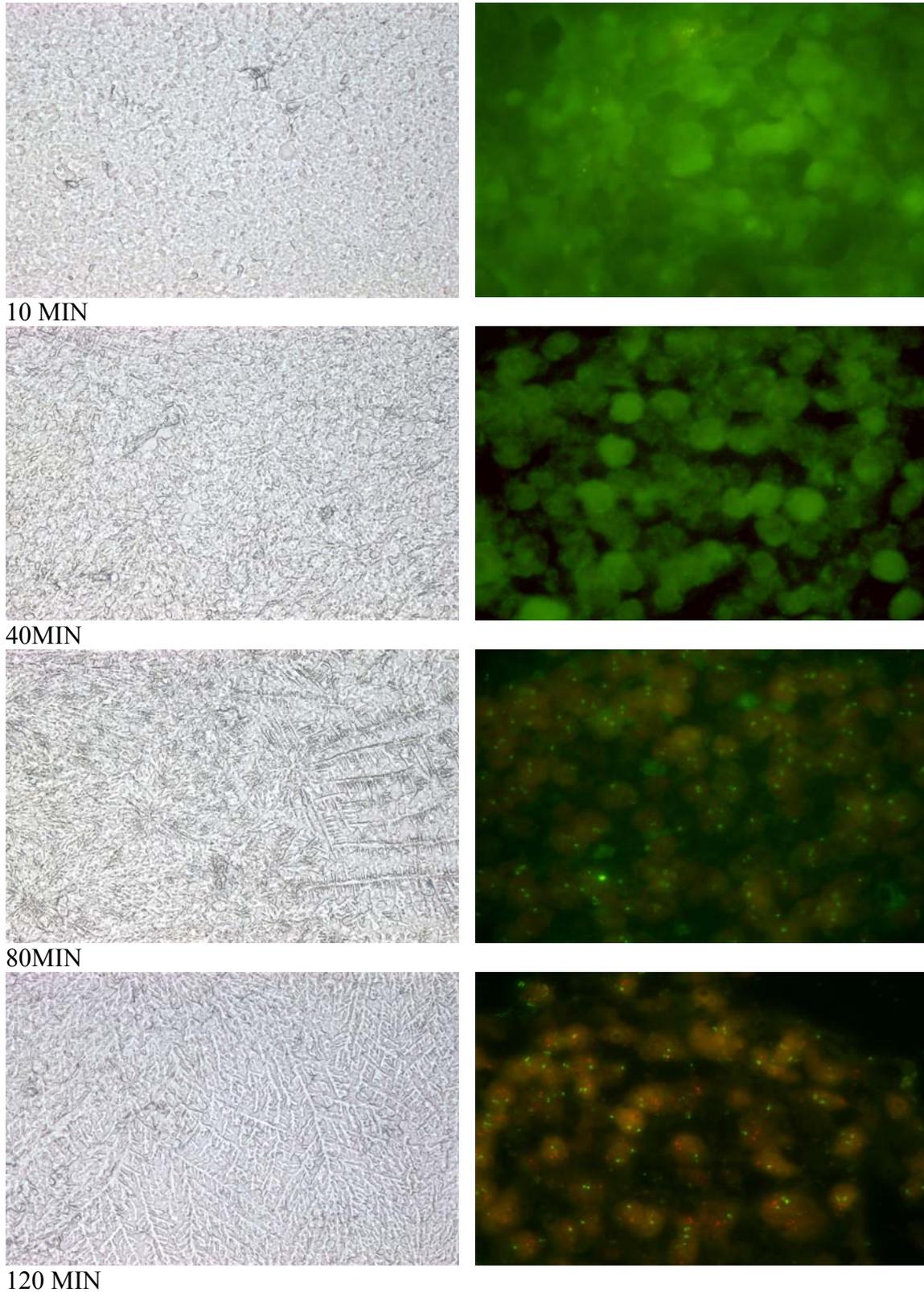


Fig 30. Digestión de un LBCG con pepsina al 0,1M, sondas *dual fusion* de Vysis LSI *BCL2/ IGH*. Las imágenes de la derecha muestran la morfología del tejido en el microscopio óptico con diferentes tiempos de digestión y las imágenes de la izquierda muestran los resultados obtenidos por FISH sobre esos tejidos.

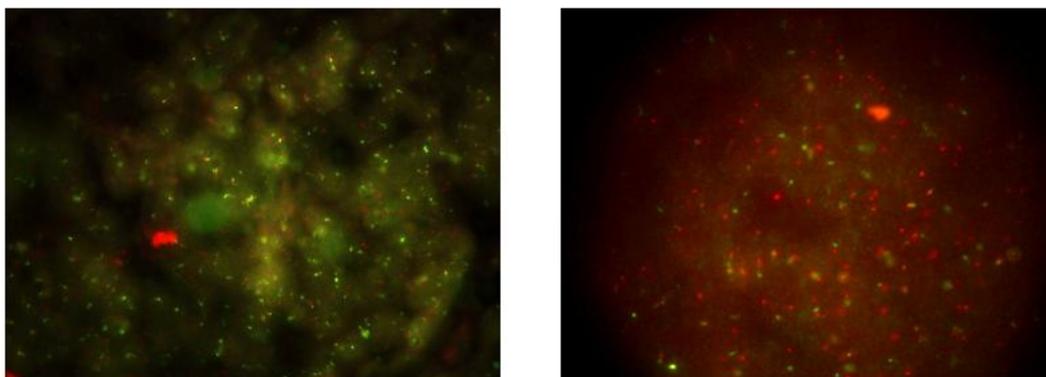


Fig 31. A: FISH positivo con autofluorescencia de fondo con *LSI/IGH/BCL2* Sondas *Dual Fusion*.
B: FISH positivo con autofluorescencia de fondo con sondas *BCL2 split Dako*.

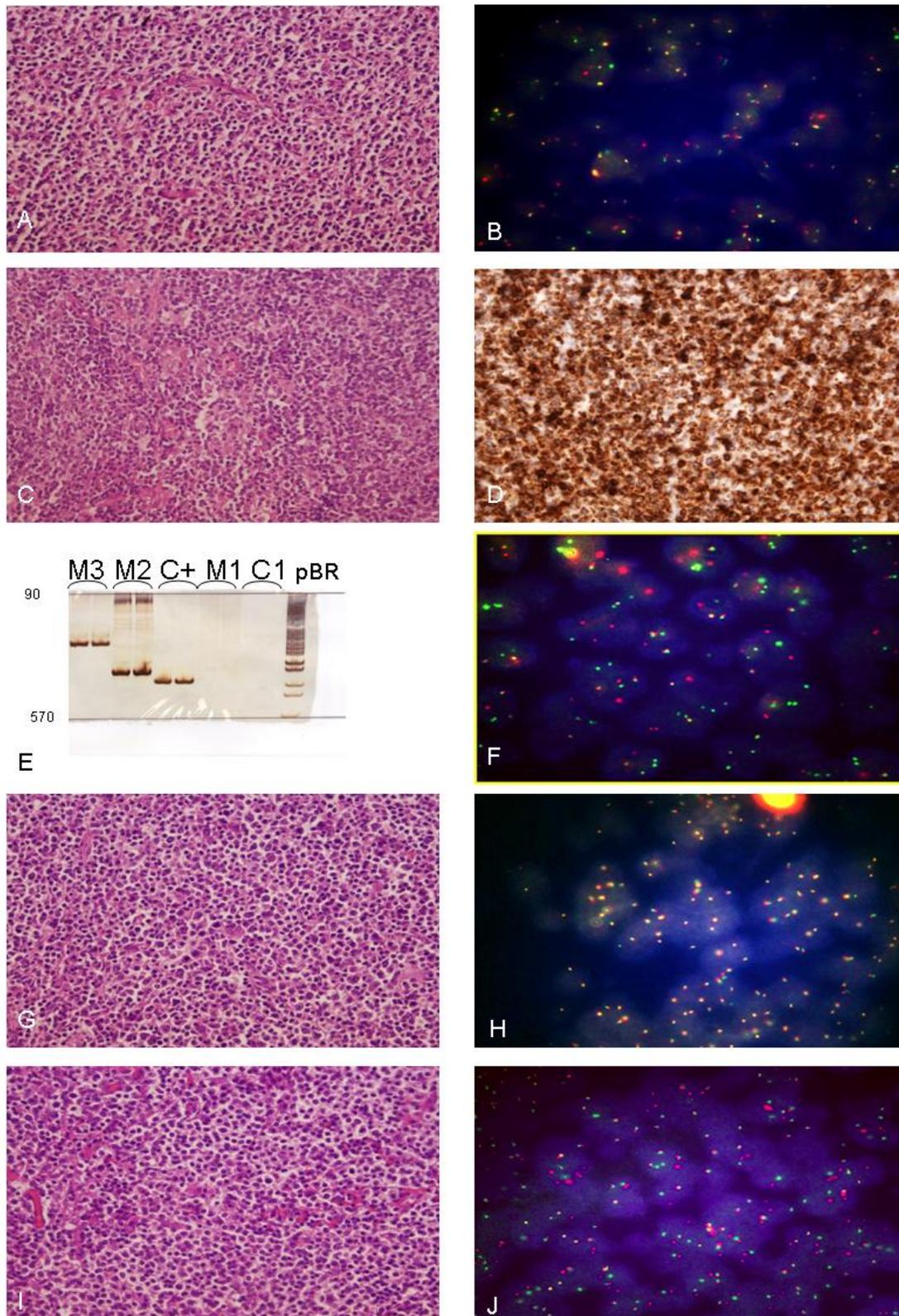


Fig 32. A: Imagen histológica de LF de grado 1, técnica (H-E 40X.) B: FISH de LF con sondas *dual fusion* de *Vysis*, translocación negativa para la t(14;18)(q32;q21)(100X). C: Imagen histológica de LF de grado 2, (H-E 40x). D: Inmunohistoquímica de LF para BCL2(40X). E: Gel acrilamida Estudio por PCR en la t(14;18)(q32;q21) cebador MBR-JH, correspondiente con un marcador de pesos moleculares (pBR), control doble negativo C- (agua), un control doble positivo C+ y tres muestras por duplicada M1(negativa), M2 (positiva), M3 (positiva). F: FISH de LF con sondas *dual fusion* de *Vysis*, translocación positiva para la t(14;18)(q32;q21)(100X). G: Imagen histológica de LF grado IIIa (H-E 20X). H: FISH de LF con sondas *split DAKO* para el estudio de la alteración 3q27, resultado negativo. I: Imagen histológica de LF de grado IIIb, (H-E 40X). J: FISH de LF con sondas *split DAKO* para el estudio de la alteración 3q27, positiva,(100X).

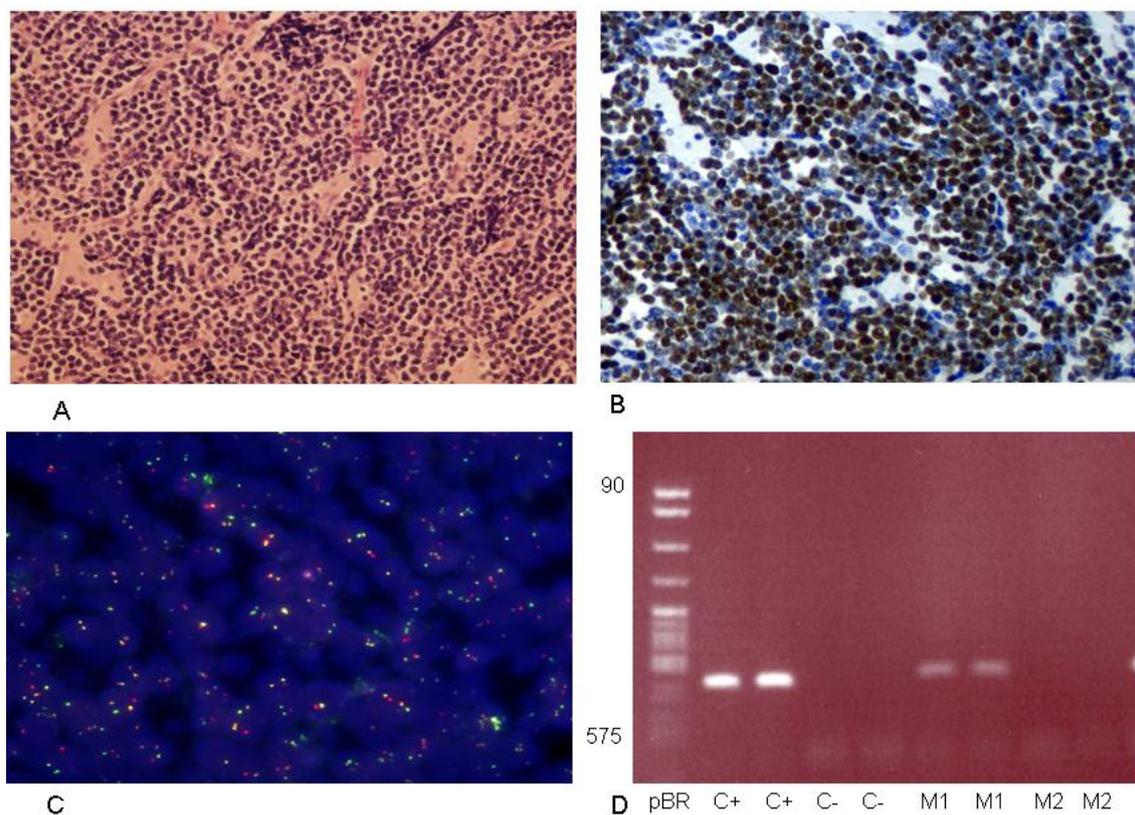


Fig 33. **A:** Imagen histológica LCM (H-E 40X). **B:** Inmunohistoquímica de la expresión de la CCND1. **C:** FISH de LF con *dual fusion de Vysis* para el estudio de la t(11;14)(q13;q32), positiva (100X). Gel de agarosa al 3%. **D:** Estudio de PCR en la t(11;14) cebador mcr-JH, correspondientes con un marcador de pesos moleculares (pBR), un control doble positivo C+, control doble negativo C- (agua), y dos muestras dobles M1(positiva), M2 (negativa).

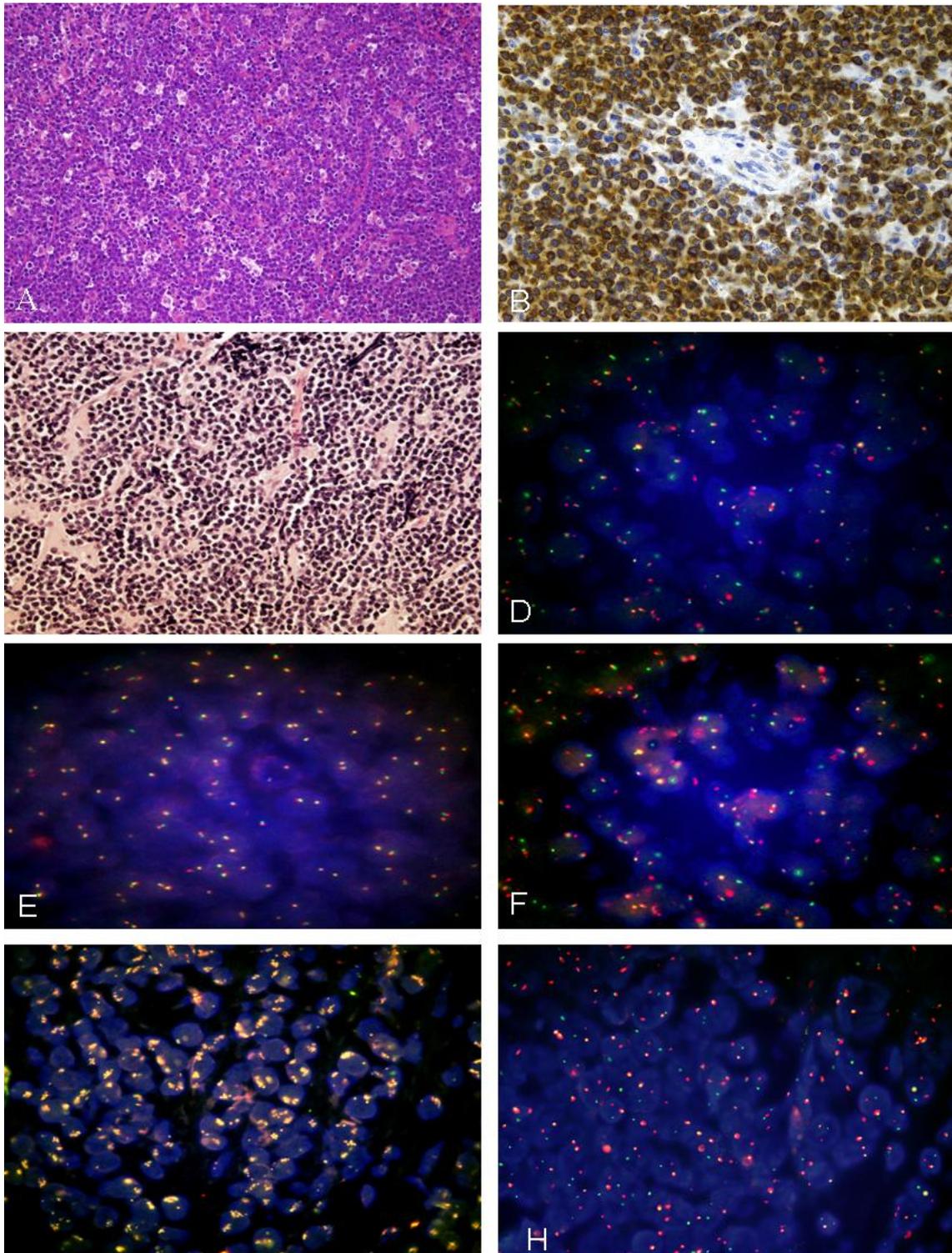


Fig 34. **A:** Imagen histológica de LBCG, técnica (H-E 40X). **B:** IHQ de LBCG anticuerpo de BCL2(40x). **C:** IHQ de LBCG anticuerpo de BCL6 (20X). **D:** FISH de LBCG con sondas *split*, translocación positiva para *BCL2* (100X). **E:** FISH de LBCG con sondas *split*, translocación negativa para *BCL2* (100X). **F:** FISH de LBCG con sondas *split*, translocación positiva para *BCL6*(100X). **G:** FISH de LBCG con sondas *split*, translocación amplificación de *MYC*(100X). **H:** FISH de LBCG con sondas *split*, translocación positiva para *MYC*(100X).

4. 6. TABLAS.

	Pretratamiento DAKO	Citrato sódico	Ac cítrico	NaSCN	EDTA
<i>Dual fusion</i>	+++	+++	++	++	++
<i>Split</i>	++++	++	+++	++	++

Tabla 6. Éxito en la técnica de FISH con diferentes pretratamientos a 99° 10 min y 15 min TA.

	autopsia	quirúrgica	endoscópica	
LF	35'	14'	7'	mínimo
	40'	33'	12'	máximo
LCM	-	20'	7'	mínimo
	-	25'	10'	máximo
LB	40'	20'	10'	mínimo
	70'	35'	12'	máximo
LBCG	70'	12'	10'	mínimo
	120'	35'	15'	máximo
amígdala	40'	15'	-	mínimo
	60'	20'	-	máximo

Tabla 7. Máximos y mínimos de los tiempos digestión en distintas muestras hasta encontrar la forma de hehecho.

Sondas <i>dual fusion</i> LSI VYSIS		Sondas <i>Split</i> DAKO	
Señales positivas	frecuencias	Señales positivas	frecuencias
3	2	1	2
5	1	2	3
6	2	3	3
7	2	4	1
8	1	5	2
9	1	6	2
10	1		
11	1		
12	1		
13	2		
15	1		

Tabla 8. Frecuencias de las señales positivas contabilizadas en 100 núcleos de 15 amígdalas reactivas.

Nº	año	edad	sexo	tejido	Grado	IHQ CD10	IHQ BCL2	FISH BCL2	MBR	mcr	FISH BCL6
1	1996	61	V	GL	I	P	P	P	P	ND	N
2	1996	60	H	GL	II	P	P	P	P	ND	N
3	1996	69	H	GL	I	P	P	P	P	ND	N
4	1996	96	H	GL	IIIa	P	P	P	P	ND	N
5	1996	54	V	GL	I	P	P	P	P	ND	N
6	1997	66	H	GL	I	P	P	P	P	ND	N
7	1997	57	H	GL	IIIb	P	P	P	P	ND	N
8	2000	76	V	GL	I	P	P	P	N	N	N
9	2001	91	V	GL	II	P	débil	P	N	N	N
10	2001	43	H	GL	I	P	P	P	P	ND	N
11	2001	76	H	GL	II	P	P	P	P	ND	N
12	2001	53	H	GL	II	P	P	P	N	P	N
13	2002	81	H	GL	I	P	P	P	N	N	N
14	2002	58	H	GL	II	N	P	N	N	N	N
15	2002	47	V	GL	IIIb	P	P	P	P	ND	N
16	2002	88	V	GL	II	P	P	P	N	N	N
17	2003	79	V	GL	I	P	P	P	N	N	N
18	2003	66	H	GL	IIIb	P	P	P	P	ND	N
19	2003	53	V	GL	II	P	P	P	N	P	P
20	2003	69	V	GL	I	P	P	P	P	ND	N
21	2003	82	V	GL	I	débil	P	N	N	N	N
22	2003	50	V	GL	I	P	P	P	N	N	N
23	2003	84	H	glúteo	IIIb	P	P	N	N	N	P
24	2003	56	V	GL	I	P	P	P	N	P	N
25	2003	50	H	GL	I	P	P	N	N	N	N
26	2003	77	H	GL	II	P	débil	N	N	P	N
27	2004	62	H	GL	IIIa	P	P	N	N	N	N
28	2004	33	V	GL	IIIb	P	P	N	N	N	N
29	2004	55	V	GL	IIIb	P	P	N	N	N	N
30	2004	68	V	GL	II	P	P	P	P	ND	N
31	2004	73	V	GL	I	P	P	P	N	N	N
32	2004	73	V	GL	I	P	P	P	N	N	N
33	2004	60	H	GL	I	débil		N	N	N	N
34	2005	61	V	GL	I	P	P	P	N	P	P
35	2005	36	H	GL	II	P	P	N	N	N	N
36	2005	80	H	GL	LF anillo sello	P	P	P	P	ND	N
37	2006	44	H	GL	I	P	P	N	N	N	N
38	2006	52	H	GL	IIIa	P	P	N	N	N	N
39	2006	68	H	GL	IIIa	P	P	N	N	N	P
40	2006	78	H	GL	II	débil	débil	N	N	N	N
41	2006	62	H	GL	IIIa	P	N	N	N	N	N
42	2006	59	H	GL	I	P	P	N	N	N	N
43	2006	48	H	parauterina	I	P	P	N	N	N	N
44	2006	35	H	GL	I	P	P	N	NV	NV	N
45	2006	71	V	GL	II	P	P	P	P	ND	N
46	2006	48	V	GL	II	P	P	P	P	ND	N
47	2006	60	V	GL	IIIb	P	P	P	P	ND	N
48	2006	58	H	GL	I	P	P	P	P	ND	N
49	2006	65	H	GL	I	P	P	P	N	N	N
50	2007	75	V	GL	II	P	P	P	P	ND	N
51	2007	75	H	GL	LF In Situ	P	P	P	P	ND	N

52	2007	44	V	GL	I	P	P	P	P	ND	N
53	2007	74	V	GL	II	P	P	P	P	ND	N
54	2007	38	V	GL	LF In Situ	P	P	P	NV	NV	N
55	2007	48	V	GL	I	P	P	P	N	N	N
56	2008	55	V	GL	IIIb	P	débil	N	N	N	P
57	2008	65	V	GL	LBCG vs IIIb	P	P	P	P	ND	P
58	2008	75	H	GL	IIIa	débil	P	N	N	N	P
59	2008	77	V	duodeno	I	P	P	P	P	ND	N

Tabla 9. V: varón, H: hembra; GL: ganglio linfático; LF: linfoma folicular, LBCG: linfoma de células grandes; VS: versus, P: positiva, N: negativa, NV: no valorable; ND: no diagnosticable.

		PCR: JH-MBR, JH-mTCs		Total
		negativo	positivo	
<i>BCL2</i> /FISH	negativa	19	0	19
	% de FISH-BCL2	100,0%	,0%	100,0%
	positiva	10	28	38
	% de FISH-BCL2	26,3%	73,7%	100,0%
Total		29	28	57
		% de FISHB-CL2	49,1%	100,0%

Tabla 10. Comparación entre las frecuencias encontradas para el reordenamiento de *BCL2* mediante técnicas de FISH y PCR en LF.

		BCL2/ IHQ			Total	
		débil	negativa	positiva		
<i>BCL2</i> /FISH	negativa	4	1	15	20	
	% de FISH-BCL2	20,0%	5,0%	75,0%	100,0%	
	positiva	1	0	38	39	
	% de FISH-BCL2	2,6%	,0%	97,4%	100,0%	
Total		5	1	53	59	
		% de FISH-BCL2	8,5%	1,7%	89,8%	100,0%

Tabla 11. Relación de la sobreexpresión de *BCL2* con el reordenamiento de *BCL2* en LF.

Nº	año	Edad	sexo	fijador	Tejido	IHQ	IHQ	FISH	MTC	mTCs
						CD5	CCND1	CCND1		
1	2000	50	H	formol	GL	NV	P	P	P	ND
2	2000	35	V	formol	GL	P	P	P	P	ND
3	2001	77	H	formol	GL	P	P	P	N	ND
4	2001	67	V	formol	GL	P	P	P	N	ND
5	2003	67	V	formol	GL	N	P	P	N	N
6	2003	82	H	formol	GL	P	P	P	N	N
7	2003	69	V	formol	GL	P	P	P	N	N
8	2004	67	H	formol	Lengua	P	P	P	P	ND
9	2004	50	H	formol	GL	P	P	P	N	N
10	2005	53	V	formol	GL	ND	N	P	N	N
11	2005	62	H	formol	GL	P	P	P	P	N
12	2005	93	V	formol	GL	ND	P	P	P	ND
13	2005	53	V	formol	GL	N	P	P	P	ND
14	2005	71	V	B5	MO	P	P	P	P	ND
15	2005	53	V	B5	MO	P	P	P	P	ND
16	2005	53	H	formol	GL	P	P	P	P	ND
17	2005	71	H	formol	GL	P	P	P	P	ND
18	2005	83	H	formol	GL	N	P	P	P	ND
19	2005	56	V	formol	GL	N	P	P	P	ND
20	2006	79	V	formol	GL	N	P	P	P	ND
21	2006	65	V	formol	GL	P	P	P	P	ND
22	2006	70	V	formol	GL	P	P	P	N	N
23	2006	70	V	formol	GL	P	P	P	N	ND
24	2006	70	V	formol	GL	ND	P	P	N	N
25	2007	76	V	formol	GL	P	P	P	P	ND
26	2007	61	V	formol	GL	P	P	P	P	ND
27	2007	90	H	formol	GL	débil	P	P	N	N
28	2007	82	V	B5	MO	P	P	P	NV	NV
29	2008	72	H	formol	GL	P	P	P	P	ND
30	2008	70	V	formol	GL		P	P	P	ND

Tabla 12. V: varón. H: hembra. GL: ganglio linfático. MO: Médula ósea. P: positivo. N: negativo. NV: no valorable. ND: no diagnosticable.

		PCR: JH-MTC, JH-mTCs			Total
		negativo	positivo	N.V.	
FISH/CCND1	positiva	11	18	1	30
	% de FISH-CCND1	36,7%	60,0%	3,3%	100,0%
Total		11	18	1	30
	% de FISH-CCND1	36,7%	60,0%	3,3%	100,0%

Tabla 13. Comparación entre las técnicas de FISH y PCR para el estudio de la t(11;14)(q13;q32)

N°	AÑO	SEXO	EDAD	DIAGNÓSTICO	ORIGEN	IHQ	IHQB	FISH	FIHS	FISH
						BCL2	BCL6	BCL2	MYC	BCL6
1	1999	H	63	LBCG	EX	P	N	N	N	N
2	2003	H	76	LBCG	G	P	NV	N	N	P
3	2003	H	76	LBCG	G	P	P	N	N	P
4	2003	H	60	LBCG	G	N	N	N	N	N
5	2003	H	58	LBCG	EX	N	N	N	N	N
6	2003	H	66	LBCG transf LF	G	P	P	P	N	N
7	2003	H	70	LBCG	G	P	NV	N	N	N
8	2003	H	63	LBCG transf LF	G	P	P	P	N	N
9	2003	V	60	LBCG	EX	P	P	N	N	P
10	2004	V	80	LBCG	G	P	P	N	N	N
11	2004	H	79	LBCG	G	N	P	N	N	N
12	2004	H	85	LBCG	EX	P	P	N	N	N
13	2004	H	56	LBCG	G	P	P	P	N	N
14	2004	V	43	LBCG	G	NV	focal	N	N	N
15	2004	V	45	LBCG	G	N	P	N	P	N
16	2004	H	27	LBCG	G	P	P	N	N	N
17	2004	H	68	LBCG	EX	N	P	N	N	N
18	2004	H	59	LBCG	G	P	P	P	N	N
19	2004	V	23	LBCG	EX	P	P	N	N	N
20	2004	V	48	LBCG	G	P	P	N	N	N
21	2005	H	62	LBCG	EX	P	P	N	N	P
22	2005	H	28	LBCG	G	P	P	N	N	N
23	2005	H	68	LBCG	G	P	P	N	P	N
24	2005	V	68	LBCG	G	P	P	N	N	N
25	2005	V	58	LBCG	EX	P	P	N	N	N
26	2005	V	91	LBCG	G	P	P	N	N	N
27	2005	H	85	LBCG	EX	N	P	N	N	N
28	2006	V	74	LBCG	EX	P	P	N	N	N
29	2006	V	64	LBCG	EX	P	P	N	N	P
30	2006	V	72	LBCG	EX	P	focal	N	N	N
31	2006	V	44	LBCG	G	P	N	N	P	N
32	2006	H	74	LBCG	EX	P	P	N	P	P
33	2006	V	57	LBCG transf LF	EX	P	focal	P	N	N
34	2006	V	67	LBCG	EX	P	P	N	N	N
35	2006	V	73	LBCG	G	N	P	N	N	P
36	2006	H	64	LBCG	G	P	P	N	N	N
37	2006	H	74	L BCG transf LNH	EX	NV	NV	N	N	P
38	2006	V	65	LBCG	G	N	P	P	N	N
39	2006	H	61	LBCG	G	P	focal	N	N	N
40	2006	V	71	LBCG	EX	P	focal	N	N	P
41	2006	V	60	L BCG transf LNH	G	P	N	N	N	N
42	2006	V	48	LBCG	EX	NV	P	N	N	N
43	2007	H	45	LBCG transf LF	G	P	P	P	N	N
44	2007	H	66	LBCG	EX	P	P	N	N	N
45	2007	H	73	LBCG	EX	P	P	N	N	P
46	2007	V	48	L BCG transf LNH	G	N	NV	N	N	N
47	2007	H	53	LBCG	G	P	P	P	N	N

Resultados

48	2007	H	42	LBCG	G	P	NV	N	N	N
49	2007	H	92	LBCG	G	P	P	N	N	N
50	2007	H	81	LBCG	EX	P	N	P	N	N
51	2007	H	35	LBCG	EX	P	focal	N	N	N
52	2007	H	58	LBCG	EX	P	P	N	N	P
53	2007	V	62	L BCG transf LNH	G	P	N	N	N	N
54	2007	V	71	LBCG transf LF	G	P	P	P	N	N
55	2008	V	77	LBCG transf LF	G	P	P	P	P	N
56	2008	V	70	LBCG	G	P	P	N	N	N
57	2008	H	77	L BCG transf LNH	G	P	P	N	N	P
58	2008	H	26	LBCG	G	P	P	P	N	N
59	2008	V	58	LBCG	G	P	P	N	N	P
60	2008	H	93	LBCG	G	P	N	N	N	N
61	2008	H	66	LBCG	G	P	P	P	N	N
62	2008	V	75	LBCG	G	P	P	N	N	P
63	2008	V	65	LBCG	G	P	focal	N	N	P
64	2008	H	82	LBCG	EX	P	P	N	N	N

Tabla 14. Varón; H: hembra; LBCG: linfoma B difuso de células grandes; LBCG Transf LNH: linfoma B de células grandes transformado de un linfoma no Hodgking. LBCG Transf. LF: Linfoma B de células grandes transformado de Linfoma Folicular. G: ganglionar; Ex: extraganglionar; P: positiva; N: negativa.

		BCL2/IHQ			Total	
		negativa	positiva	N. V.		
BCL2/FISH	negativa	8	40	3	51	
	% BCL2FISHS	15,7%	78,4%	5,9%	100,0%	
	positiva	1	12	0	13	
	% BCL2FISHS	7,7%	92,3%	,0%	100,0%	
Total		9	52	3	64	
		% BCL2FISHS	14,1%	81,3%	4,7%	100,0%

Tabla 15. Tabla de contingencia relación entre la sobreexpresión de BCL2 y el reordenamiento en LBCG

		BCL/6IHQ				Total	
		negativa	positiva	focal	N.V.		
BCL6/FISH	negativa	8	33	5	3	49	
	%BCL6FISH	16,3%	67,3%	10,2%	6,1%	100,0%	
	positiva	0	11	2	2	15	
	%BCL6FISH	,0%	73,3%	13,3%	13,3%	100,0%	
Total		8	44	7	5	64	
		%BCL6FISH	12,5%	68,8%	10,9%	7,8%	100,0%

Tabla 16. Tabla de contingencia relación entre la sobreexpresión de BCL6 y el reordenamiento en LBCG

	BCL-2 germinal N° (%)	BCL-2 reordenado N°(%)	P
SEXO			
mujeres	27 (52.9)	9 (69.2)	NS (Fisher)
hombres	24(47.1)	4(30.8)	
AÑOS media+DT			
<65	24(47.1)	8(61.5)	NS (Fisher)
≥65	27(52.9)	5(38.5)	
LOCALIZACIÓN			
ganglionar	29(56.9)	11(84,6)	0,052 (Fisher)
extraganglionar	22(43.12)	2(15,4)	
ECOG			
0	10(20.4)	5(41.7)	NS(Chi-cuadrado)
1	15(30.6)	4(33.3)	
2	11(22.4)	1(16.7)	
3	5(10.2)	1(8.3)	
4	8(16.3)	0(0)	
ESTADÍO			
I	6(11.8)	1(7.7)	0,035(Chi-cuadrado)
II	11(21.6)	0 (0)	
III	6(11.8)	6(46.2)	
IV	26(51)	5(38.5)	
NV	2(3.9)	1(7.7)	
LDH			
NORMAL<250	7(14.3)	2(16.7)	NS (Fisher)
ALTA>250	42(85.7)	10(83.3)	
N° LOCALIZACIONES EXTRAGANGLIONAR.			
ninguna	6(11.8)	3(23.1)	NS(Chi-cuadrado)
1 -2	31(60.8)	4(30.8)	
>2	12(23.5)	5(38.5)	
MO			
libre	27(52.9)	7(53.8)	NS (Fisher)
infiltrado	11(21.6)	2(15.4)	
NV	13(25.5)	4(30.8)	
N° LOCALIZACIONES GANGLIONARES			
ninguna	8(15.7)	2(15.4)	NS(Chi-cuadrado)
1 -2	14(27.5)	4(30.8)	
>2	27(52,9)	6(46.2)	
IPI			
bajo 0-1	10(20.4)	3(25)	NS(Chi-cuadrado)
Intermedio bajo (2)	9(18.4)	3(25)	
Intermedio alto (3)	18(36.7)	4(33.3)	
alto (4 -5)	12(24.5)	2(16.6)	
Respuesta			
Remisión completa	21(41.2)	5(38.5)	NS(Chi-cuadrado)
Remisión Parcial	2(3.9)	0(0)	
recaída	8(15.8)	5(38.5)	
no respuesta	16(31.4)	3(23.1)	
NV	4(7.8)	0	
OS	23(95%CI36,3-65,4%)	5 (95% CI 32,58-116,6%)	NS (Log-Rank)

Tabla 17. Relación entre el reordenamiento de BCL2, evolución pronóstica y supervivencia. NS: no significativo

BCL2/FISHS	N° total	N° de eventos	Censurado	
			N°	Porcentaje
negativa	47	23	24	51,1%
positiva	13	5	8	61,5%
Global	60	28	32	53,3%

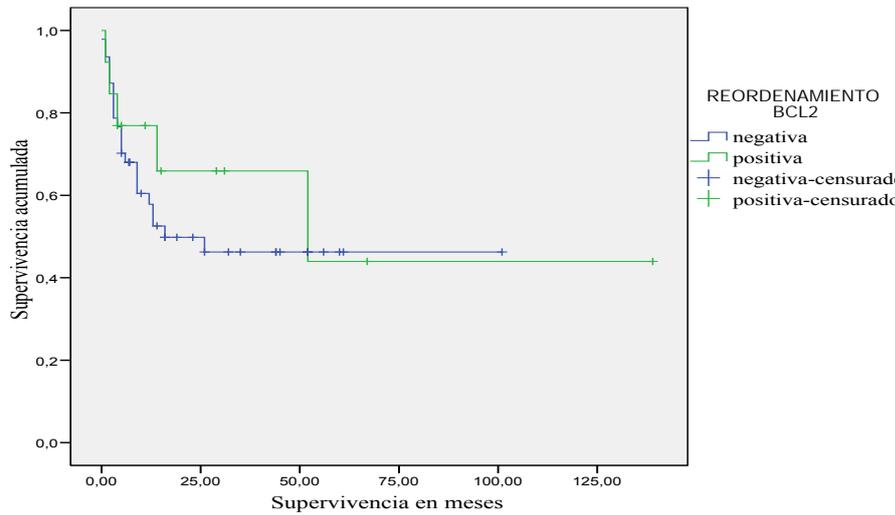


Tabla 18. Resumen del procesamiento de los casos para la curva y curva de Supervivencia global (Kaplan-Meier) comparación entre pacientes diagnosticados con LBCG con y sin reordenamiento de BCL2

BCL2/IHQ	N° total	N° de eventos	Censurado	
			N°	Porcentaje
negativa	9	4	5	55,6%
positiva	49	23	26	53,1%
Global	58	27	31	53,4%

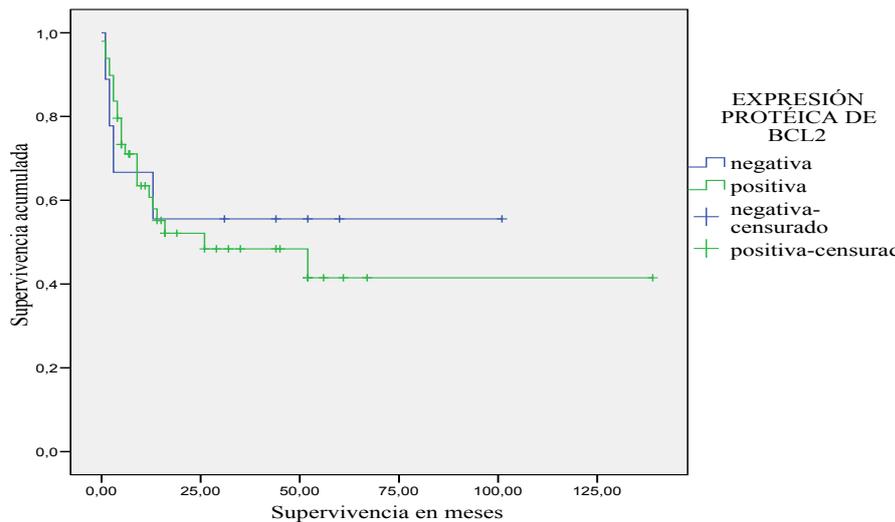


Tabla 19. Resumen del procesamiento de los casos para la curva y curva de Supervivencia global (Kaplan-Meier) comparación entre pacientes diagnosticados con LBCG con y sin expresión de BCL2

	BCL-6 germinal (%)	BCL-6 reordenado (%)	P
SEXO			
mujeres	28(57.1)	8(53.3)	NS (Fisher)
hombres	21(42.9)	7(46.7)	
AÑOS media+DT			
<65	26(53.1)	6(40)	NS (Fisher)
≥65	23(46.9)	9(60)	
LOCALIZACIÓN			
ganglionar	33(67.3)	7 (46.7)	NS (Fisher)
extraganglionares	16(37.7)	8 (53.8)	
ECOG			
0	12(25.5)	3(21.4)	NS (Chi-cuadrado)
1	16(34)	3(21.4)	
2	10(21.3)	3(21.4)	
3	3(6.4)	3(21.4)	
4	6(12.8)	2(14.3)	
ESTADÍO			
I	7(14.3)	0 (0)	NS (Chi-cuadrado)
II	8(16.3)	3(20)	
III	9(18.4)	3(20)	
IV	23(46.9)	8(53.8)	
NV	2(4.1)	1(6.7)	
LDH			
NORMAL<250	8(17)	1((7.1)	NS (Fisher)
ALTA>250	39(83)	52(85.2)	
MO			
libre	27(55.1)	7(46.7)	NS (Fisher)
infiltrado	10(20.4)	3(20)	
NV	12(24.5)	5(33.3)	
Nº LOCALIZACIONES EXTRAGANGLIONAR.			
ninguna	5(10.2)	4(26.7)	NS (Chi-cuadrado)
1- 2	26(53.1)	9(60)	
>2	16(32.7)	1(6.7)	
Nº LOCALIZACIONES GANGLIONARES			
ninguna	9(18.4)	1(6.7)	0,059(Chi-cuadrado)
1 -2	1(6.7)	1(6.7)	
>2	21(42.8)	12(80)	
IPI			
bajo 0-1	11(23.40)	2(14.28)	NS (Chi-cuadrado)
Intermedio bajo (2)	10(21.3)	2(14.28)	
Intermedio alto (3)	16(34)	6(42.9)	
alto (4 -5)	10(21.27)	4(28.57)	
Respuesta			
Remisión completa	18(36.7)	8(53.3)	NS (Chi-cuadrado)
Remisión Parcial	2(4.1)	0(0)	
recaída	12(24.5)	1(6.7)	
no respuesta	14(28.6)	5(33.3)	
NV	3(6.1)	1(6.7)	
OS	14(95%CI 53,13-94,23%)	6(95%CI 9,48-21,68%)	NS Log-Rank

Tabla 20. Relación entre el reordenamiento de BCL6, evolución pronóstica y supervivencia.

<i>BCL6</i> /FISH	Nº total	Nº de eventos	Censurado	
			Nº	Porcentaje
negativa	46	21	25	54,3%
positiva	14	7	7	50,0%
Global	60	28	32	53,3%

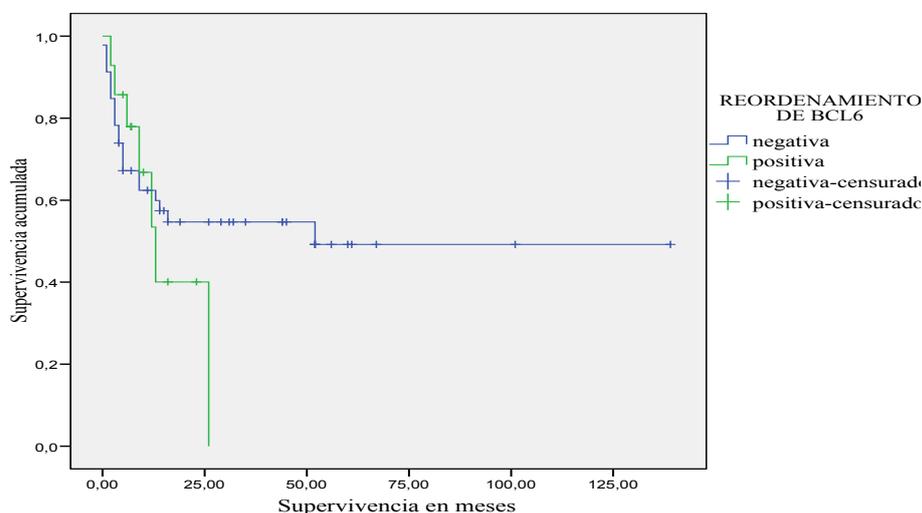


Tabla 21. Resumen del procesamiento de los casos para la curva y curva de Supervivencia global (Kaplan-Meier) comparación entre pacientes diagnosticados con LBCG con y sin reordenamiento de *BCL6*.

<i>BCL6</i> /IHQ	Nº total	Nº de eventos	Censurado	
			Nº	Porcentaje
negativa	8	7	1	12,5%
positiva	47	20	27	57,4%
Global	55	27	28	50,9%

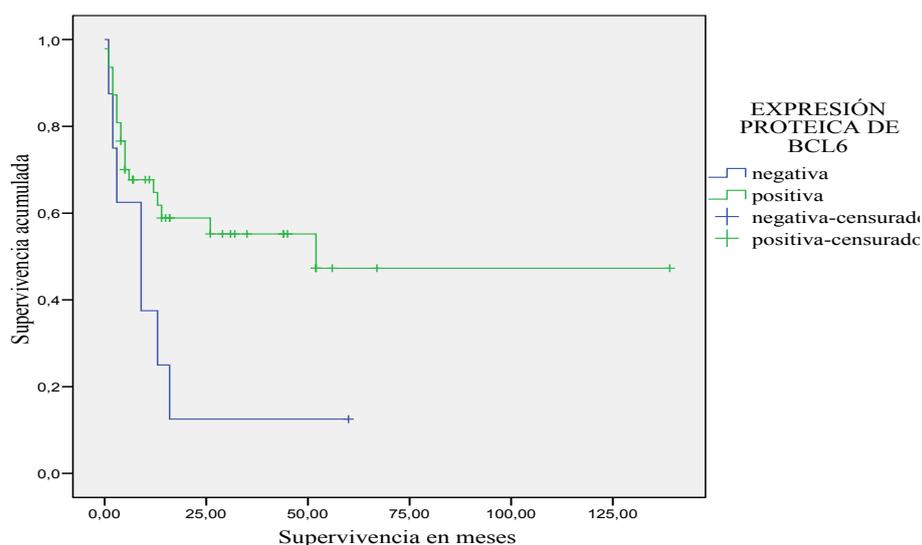


Tabla 22. Resumen del procesamiento de los casos para la curva y curva de Supervivencia global (Kaplan-Meier) comparación entre pacientes diagnosticados con LBCG con y sin expresión de *BCL6*.

	MYC germinal (%)	MYC reordenado(%)	P
SEXO			
mujeres	34(57.6)	2(40)	NS (Fisher)
hombres	25(42.4)	3(60)	
AÑOS media+DT			
<65	26(53,1)	6(40)	NS (Fisher)
≥65	23(46.9)	9(60)	
LOCALIZACIÓN			
ganglionar	36(61)	4(80)	NS (Fisher)
extraganglionar	23(39)	1(20)	
ECOG			
0	14(25)	1(20)	NS (Chi-cuadrado)
1	17(30.4)	2(40)	
2	13(23.2)	0(0)	
3	4(7.1)	2(40)	
4	8(14.3)	0(0)	
ESTADÍO			
I	7(11.9)	0(0)	NS (Chi-cuadrado)
II	11(18.6)	0(0)	
III	11(18.6)	1(20)	
IV	27(45.8)	4(80)	
NV	3(5.1)	0	
LDH			
NORMAL<250	8(14.3)	1(20)	NS (Fisher)
ALTA>250	48(85.7)	4(80)	
MO			
libre	32(54.2)	2(40)	0,054 (Fisher)
infiltrado	10(16.9)	3(60)	
NV	17(28.8)	0	
Nº LOCALIZACIONES EXTRAGANGLIONAR.			
ninguna	8(13.6)	1(20)	NS(Chi-cuadrado)
1-2	32(54.2)	3(60)	
>2	16(27.1)	1(20)	
NV	3	0	
Nº LOCALIZACIONES GANGLIONARES			
ninguna	10(16.7)	0 (0)	0,55(Chi-cuadrado)
1 -2	17(28.8)	1(20)	
>2	29(49.2)	4(80)	
NV	3(5.1)	0	
IPI			
bajo 0-1	13(23.21)	0(0)	NS(Chi-cuadrado)
Intermedio bajo (2)	10(17.85)	2(40)	
Intermedio alto (3)	20(35.71)	2(40)	
alto (4 -5)	13(23.21)	1(20)	
Respuesta			
Remisión completa	25(42.4)	1(20)	NS(Chi-cuadrado)
Remisión Parcial	1(1.7)	1(20)	
recaída	12(20.3)	1(20)	
no respuesta	17(28.8)	2(40)	
OS	24(95%CI 36,3-65,13%)	4(95%CI 32,58-116,6%)	NS (Log-Rank)

Tabla 23. Relación entre el reordenamiento de MYC, evolución pronóstica y supervivencia.

MYCFISH	N° total	N° de eventos	Censurado	
			N°	Porcentaje
negativa	55	24	31	56,4%
positiva	5	4	1	20,0%
Global	60	28	32	53,3%

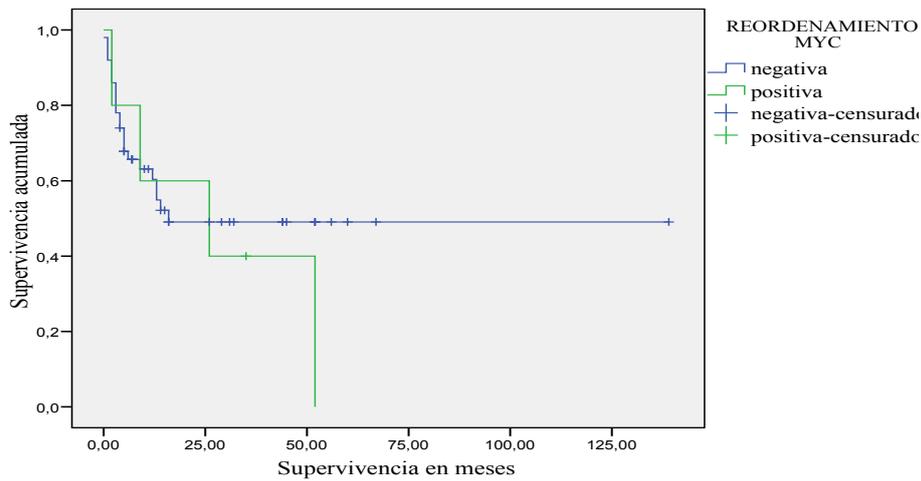


Tabla 24. Resumen del procesamiento de los casos para la curva y curva de Supervivencia global (Kaplan-Meier) comparación entre pacientes diagnosticados con LBCG con y sin reordenamiento a MYC.

REORDENAMIENTOS: BCL2, BCL6, MYC	N° total	N° de eventos	Censurado	
			N°	Porcentaje
negativa	31	15	16	51,6%
positiva	29	11	18	62,1%
Global	60	26	34	56,7%

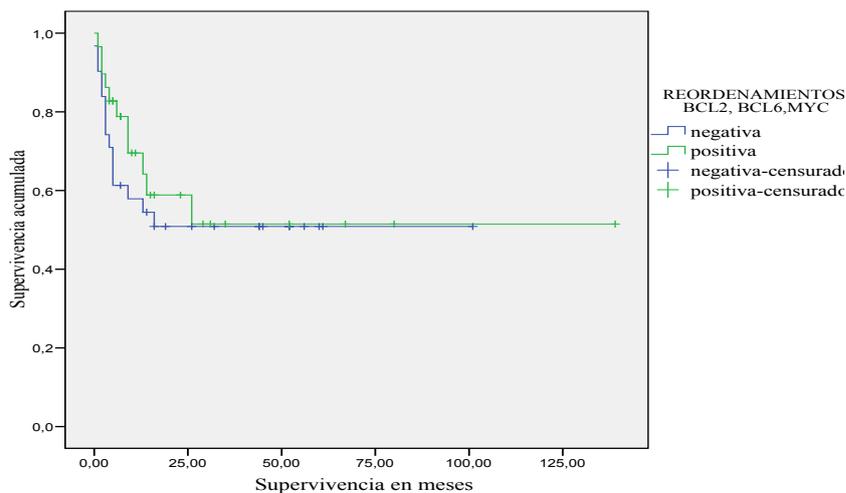


Tabla 25. Resumen del procesamiento de los casos y curva de Supervivencia global (Kaplan-Meier) comparación entre pacientes diagnosticados con LBCG con y sin reordenamientos BCL2, BCL6, MYC.

5. Artículos publicados

Looking for Ferns: Optimization of Digestion Pretreatment in Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) Technique on Paraffin-embedded Tissues

Marta Tojo, BSc,* Raquel Perez-Becerra, BSc,* Angel Vazquez-Boquete, BSc,*
Aranca García-Rivero, BSc,† Tomas García-Caballero, MD, PhD,*
Jeronimo Forteza, MD, PhD,* and Maximo Fraga, PhD*

Abstract: Fluorescence in situ hybridization (FISH) is a useful cytogenetic technique for the detection of chromosome aberrations. However, applying this technique routinely on paraffin-embedded tissue is hampered by technical problems. The efficiency of hybridization is influenced by formalin fixation time, and this may vary considerably between specimens. We present a simple method for improving hybridization by microscopically monitoring the time of enzymatic digestion. To establish optimal digestion time, enzymatic digestion was stopped at 3-minute intervals for biopsies and 10-minute intervals for autopsies in 24 paraffin-embedded samples. At every stop, tissue morphology was examined under light microscopy to determine if observed changes could be correlated with subsequent FISH results. The appearance of fernlike formations was found to mark the optimal digestion time that produced the strongest hybridization signals. Using this method of digestion time control, an additional 41 cases were evaluated for FISH with various types of probe. Monitoring under the microscope could be more spaced if the morphology did not change after the first visual control and could be adapted to the type of sample (in general, endoscopic samples, total digestion time of about 10 min; routine biopsies, 15 to 30 min; autopsy samples, 20 to 40 min). In every case, the appearance of the fernlike pattern correlated with proper hybridization signal. Monitoring digestion time for the appearance of fernlike structures is a useful method for improving reproducibility of FISH technique on paraffin-embedded samples. It is particularly useful when dealing with samples under heterogeneous fixation conditions (consultations, autopsies, etc.), because it eliminates the need for repetition.

Key Words: FISH, pretreatment, optimization, paraffin-embedded, enzymatic digestion

(*Diagn Mol Pathol* 2008;17:59–63)

Fluorescence in situ hybridization (FISH) is a useful technique for the study of numerical and structural genetic abnormalities in metaphase and interphase cells. It has important advantages over other genetic testing methods, such as polymerase chain reaction (PCR), reverse transcription-PCR, and conventional cytogenetics.^{1–3} It is widely used on cell suspensions, imprints, and frozen tissues. However, its routine application on paraffin-embedded tissues, which represent the major source of diagnostic material in anatomic pathology laboratories, is hampered by technical problems.^{4–7} The most common include weakness or inconsistency of hybridization signals and the presence of high background fluorescence, which can render results uninterpretable. In addition, the interpretation of FISH on tissue sections may be more complex by truncated and/or overlapping nuclei (resulting in lack and/or overlap of hybridization signals).⁸ To overcome these difficulties, some authors have advocated the use of isolated nuclei from thick tissue sections^{8,9}; however, this method is limited because morphologic correlation cannot be made.⁴ In our opinion, the ideal technique continues to be FISH on whole thin section, as the overall structure is preserved and comparison can be made with hematoxylin and eosin and/or immunostainings performed in serial sections.

The technical problems with FISH on paraffin-embedded tissue can be divided into 2 related groups. First, there are factors inherent to tissue conditions, namely initial tissue handling, fixation conditions, paraffin-embedding process, and even specimen age.^{7,10} Second, there are factors involving the technical steps of FISH designed to minimize the impact of previous tissue conditions, that is enzymatic pretreatment, hybridization conditions, and posthybridization washing conditions.⁵ A particularly important factor is fixation, because it influences the efficiency of hybridization and, unfortunately, may be highly variable between specimens. For

From the *Departamento de Anatomía Patológica y Ciencias Forenses and Servicio de Anatomía Patológica, Complejo Hospitalario Universitario de Santiago, Santiago de Compostela, Spain; and †Servicio de Genética, Centro Oncológico, A Coruña, Spain.

This work was supported by a grant from Instituto de Salud Carlos III (FIS PI 061902).

Reprints: Maximo Fraga, PhD, Departamento de Anatomía Patológica y C. Forenses and Servicio de Anatomía Patológica, Complejo Hospitalario Universitario de Santiago, Spain (e-mail: apfraga@usc.es).

Copyright © 2008 by Lippincott Williams & Wilkins

most Anatomic Pathology laboratories, formalin is the standard fixative. Formalin results in the formation of methylene bridges between amino groups in the DNA and/or proteins, which helps to preserve the cellular composition and morphology of the tissue but reduces the penetration of acid nuclei probes.¹¹ Therefore, pretreatment of sections, usually in the form of enzymatic digestion, is a key step in FISH technique on formalin-fixed tissues.

An extended fixation time is known to substantially reduce the number of hybridization signals.⁵ There is general agreement that the longer the fixation, the stronger should be the pretreatment of tissue sections,¹² which is similar to other techniques, such as immunohistochemistry.¹³ As fixation may be quite variable between specimens, the use of a standard pretreatment may result in failure of FISH technique. Consequently, if initial results are unsatisfactory, a "trial and error" approach is usually performed; that is, analysis is repeated with increased pretreatment.¹⁴ However, this may be time consuming. Another option is to perform FISH simultaneously on several sections from the same specimen with different pretreatment intensities. However, this requires tissue sections that could be employed for other purposes.

There are considerable technical variations in FISH on paraffin-embedded samples, especially regarding factors such as section thickness and dilution as well as time and type of enzyme. Pepsin and proteinase K are widely used in enzymatic digestion. With these proteases, digestion usually takes between 10 and 30 minutes, which is obviously influenced by tissue-section thickness and enzyme concentration.^{1,8,15,16}

We present a simple method that improves hybridization in FISH on paraffin-embedded samples by monitoring the time of enzymatic digestion under microscopic control and also saves time and reagents by reducing repetition and increasing reproducibility.

MATERIALS AND METHODS

Tissue Samples

To perform this study, we analyzed 65 formalin-fixed paraffin-embedded tissue samples from the Hospital Clínico-Universitario de Santiago: 12 normal tonsils as negative control for translocation for each probe set, 15 follicular lymphomas, 15 mantle cell lymphomas, 15 Burkitt lymphomas, and 8 anaplastic cell lymphomas. Three-micron thick sections were cut from each case and placed in pretreated slides (ChemMate Capillary Gap Microscope Slides, DakoCytomation, Glostrup, Denmark).

Probes

The detection of chromosome translocations was carried out using 4 probe sets from Vysis, Inc (Downers Grove, IL): (1) LSI IGH SpectrumGreen/LSI BCL2 SpectrumOrange for *t*(14;18) detection, (2) LSI IGH SpectrumGreen/LSI CCND1 SpectrumOrange for *t*(11;14) detection, (3) LSI IGH SpectrumGreen/MYC

SpectrumOrange/CEP8 SpectrumAqua for *t*(8;14) detection, and (4) LSI ALK Dual Color Probe SpectrumGreen/SpectrumOrange for translocations involving band 2p23.

Pretreatment Protocol

Slides were dried overnight at 55°C or at 60°C for 20 minutes. Deparaffination and rehydration was carried out with 3 xylene washes, 2 absolute-alcohol washes, two 96°C alcohol washes, and 1 distilled-water wash, each for a period of 3 minutes.

After deparaffination and rehydration, slides were placed in SSC2 × (saline sodium citrate) wash for 3 minutes in water bath. To avoid or mitigate tissue autofluorescence, slides were immersed in HCl (acid chlorhydric) 0.1 M for 20 minutes (in our experience, this step is not essential).

Paraffin-embedded sample pretreatment was carried out with a NaSCN (sodium thiocyanate) 1 M, at 80°C for 30 minutes (some samples were pretreated with citric acid yielding similar results). Afterwards, slides were placed in distilled water for 1 minute and in SSC2 × for 5 minutes.

Enzymatic Digestion

To perform the enzymatic digestion protocol, we used 0.05 mg/mL pepsin solution in HCl 0.01 N or 0.01 mg/mL proteinase K solution in buffer TE (Tris 10 mM, ethylene diaminetetra acetic acid 1 mM pH 8). Initially, to find optimal digestion time, series sections were made for 24 cases. Enzyme activity for the various sections taken from each specimen was stopped at different times (3-min intervals for biopsies and 10-min intervals for autopsy samples). Stop process consisted in slide immersion in SSC2 × for 1 minute and tissue drying in thermal plate at 45°C; this wash step proved to be indispensable for discerning morphologic tissue modifications, as we will describe later. Tissue appearance was then observed under light microscopy with 10 × and 40 × lenses with slightly closed diaphragm. After that, the FISH technique was continued to evaluate the efficiency of each digestion time. From these initial tests, it became evident that optimal tissue digestion was achieved when tissue showed fernlike formations under light microscopy.

This method for optimizing digestion was then applied to the remaining routine pathologic diagnostic samples (41 more cases).

After detecting fernlike formations, the slides were placed in 2 baths of SSC2 × for 3 minutes and dehydrated in increasing alcohol solutions of OH70, OH96, and OH100°C for 2 minutes each. Then the slides were air dried at room temperature for 15 minutes.

Probe Preparation and Hybridization

Probe mix was carried out according to the manufacturer's specifications. We avoided using formaldehyde because of its health risks. Hybridization was performed either on a thermal plate or on the DakoCytomation Hybridizer (Dako Co, Denmark), first at 84°C for 5 minutes and finally at 37°C overnight.

Stringent Wash and Preparation Mounting

For posthybridization washes, we used SSC0.4 × with 0.3% NP-40 (Nonidet P-40) at 73°C for 3 minutes. Then the slides were placed in SSC2 × with 0.1% NP-40 at room temperature. Afterwards, the slides were air dried for 20 minutes and mounted in DAPI II (4'-6'-diamidino-2-feniloide) counterstain from Vysis, Inc (Downers Grove, IL).

Image Analysis

Image analysis was performed and photographed using an Eclipse E400 Nikon fluorescence microscope (Nikon, Tokyo, Japan) equipped with DAPI (nuclei) and SpectrumGreen/SpectrumOrange dual bandpass filter sets.

RESULTS

As previously described, we initially tried to optimize the digestion step in 24 paraffin-embedded samples by stopping enzymatic digestion at 3/10-minute intervals. Every stop was followed by observation of tissue appearance under light microscopy. After that, the FISH technique was continued to evaluate the effectiveness of different digestion times.

We found that optimal tissue digestion was achieved when tissue showed fernlike formations under light microscopy, regardless of whether pepsin or proteinase K was used. When fernlike formations were not observed, either by shorter or longer digestion, the hybridization signals were lacking or very weak. It must be stressed that the only stop solutions with which we found fernlike arrangement was SSC2 ×.

This method for optimizing digestion was then applied to the remaining routine pathologic diagnostic samples (41 additional cases). Accordingly, digestion time was highly variable and related to the type of sample. The extreme values were 9 and 120 minutes; the longest value was extraordinary and occurred in only one autopsy sample (Fig. 1). The usual digestion times were 9 to 12 minutes for endoscopic biopsies, 15 to 30 minutes for surgical biopsies, and 25 to 40 minutes for autopsies.

With this microscopic monitoring of digestion time procedure, an adequate hybridization signal was obtained in every case.

DISCUSSION

FISH is a powerful technique for the detection of numerical and structural chromosomal aberrations. In this respect, it has well-known advantages over classic cytogenetics and molecular techniques such as Southern blot and PCR; for example, the ability to study interphase cells, and its very high sensitivity. The availability of commercial probes for FISH detection of chromosomal abnormalities has facilitated its incorporation into the routine diagnostic armamentarium, best exemplified in hematopathology.^{17,18}

FISH is a well-established technique that is easy to perform in fresh cell suspensions or lymph node imprints

that have been fixed with methanol and glacial acetic acid. However, its application on paraffin-embedded tissues is hampered by several technical problems, mainly the inability to obtain an optimal signal from probes. One reason for this is that fixatives and paraffin interfere with the hybridization step that can give rise to nonconclusive results.⁵ Nevertheless, efforts must be made to solve such problems, because paraffin-embedded samples are a common source of diagnostic material in pathology laboratories and are essential for carrying out retrospective studies.^{11,19}

A variety of pretreatments, such as microwaving and/or protease digestion,^{6,15,16} has been proposed for obtaining good results with FISH on paraffin sections. With respect to protease digestion, both proteinase K and pepsin have been used, but there is considerable heterogeneity among studies concerning their concentration and digestion time. Although relatively good results have been reported using a common digestion time for all biopsies in paraffin sections (usually ranging from 10 to 30 min),^{1,10,15,16} individual optimization is often recommended to obtain best results and greater reproducibility.²⁰

In our opinion, empirical optimization is a time-consuming and reactive-consuming approach, owing to ample variations in biopsy fixation times. This is particularly evident in samples of consultation cases from other centers, it may be even more dramatic in autopsy samples,²¹ where fixation is usually intense. An extreme example was one autopsy case in which digestion pretreatment was as long as 120 minutes.

When we began method testing (24 initial cases), we checked the morphologic appearance of the tissue in 3/10-minute intervals (see section Materials and Methods). Afterwards, when additional cases were being evaluated, we realized that monitoring under the microscope could be more spaced if the morphology did not change after the first visual control, and it could be adapted to the type of sample, thus avoiding unnecessary morphologic checking: in general, endoscopic samples required a total digestion time of about 10 minutes, routine biopsies 15 to 30 minutes, and autopsy samples 20 to 40 minutes. On the other hand, if the fernlike pattern begins to appear, usually in the edge of the section, the digestion should be stopped shortly thereafter.

Required digestion time is influenced not only by fixation and enzyme concentration, but also by thickness of paraffin sections. In our experience, 3- μ m thick sections were most suitable for digestion control and interpretation of the results (data not shown). Thicker sections need longer digestion and are more prone to overlapping of nuclei.^{8,22}

The fernlike pattern was observed regardless of whether pepsin or proteinase K were used. Proteinase K has been reported to leave highly fluorescent speckles within the cells.¹¹ Other authors mention the influence of enzymatic pretreatment on the efficiency of hybridization, and they note that the best results were obtained with

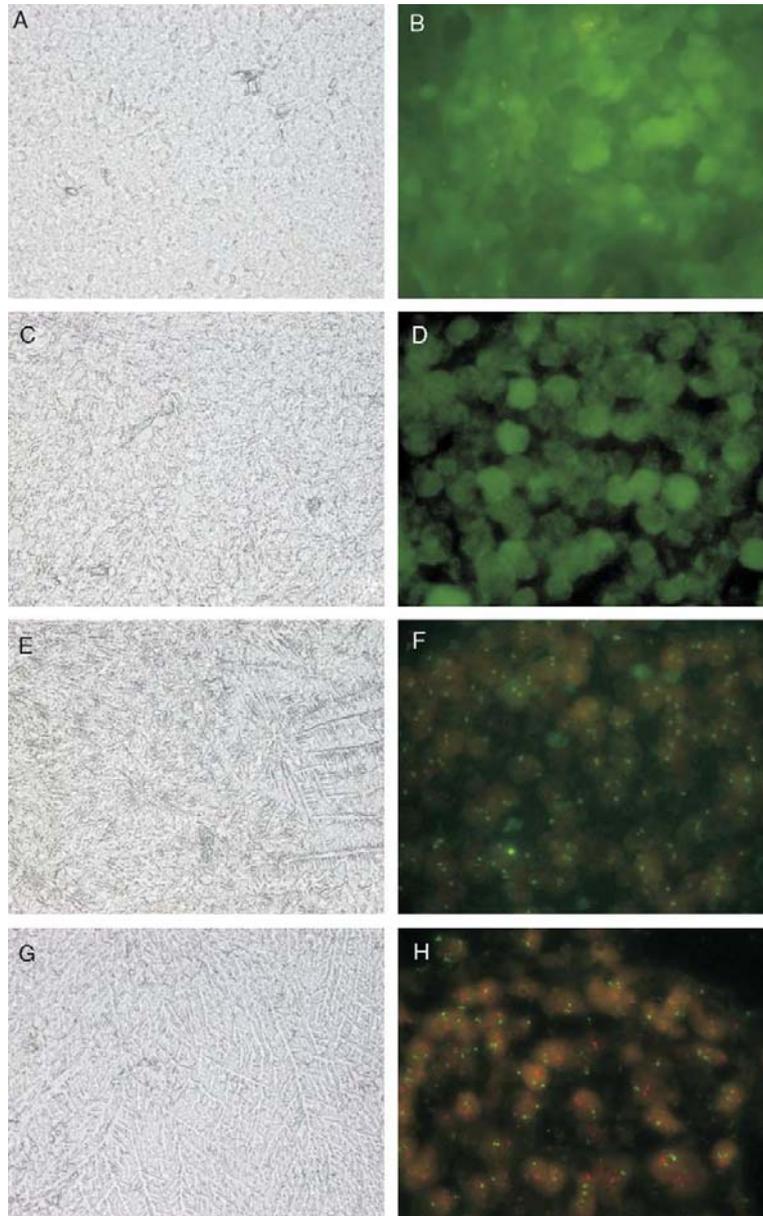


FIGURE 1. An outstanding example of the influence of digestion time in tissue morphology and hybridization efficiency (autopsy sample): as digestion time increases (A, B), 10 minutes; (C, D), 40 minutes; (E, F), 80 minutes; (G, H), 120 minutes fernlike image (left side) is more clearly displayed and hybridization signals are improved (right side). BCL2/IgH probe set from Vysis, Inc (Downers Grove, IL) (green signals, IgH; red signals, BCL2; no nuclear counterstaining).

pepsin.⁵ However, these observations are not supported by our experience. The advantage of using pepsin is that it is dependent on pH and ceases to act without the need for a stop reactive when pH is changed.

As we have done for FISH, some authors have also stressed the appropriateness of other PCR techniques for the morphologic evaluation of pretreated samples. For in situ PCR, Bagasra and Harris²³ recommend stopping

digestion when small round bubbles appear on the cytoplasmic membrane of the cells-of-interest.

In conclusion, the method here proposed, controlling digestion time until visualization of fernlike structures on the sample under light microscopy, is highly useful insofar as optimizing the results of hybridization is concerned. Repeated attempts are not necessary for a successful technique, thus saving time and reagents and it is particularly useful when dealing with consultation cases or autopsy samples.

ACKNOWLEDGMENT

The authors are indebted to Luisa Anllo for her expert technical assistance.

REFERENCES

- Einerson RR, Kurtin PJ, Dayharsh GA, et al. FISH is superior to PCR in detecting *t*(14;18)(q32;q21)-IgH/bcl-2 in follicular lymphoma using paraffin-embedded tissue samples. *Am J Clin Pathol*. 2005;124:421–430.
- Siebert R, Weber-Matthiesen K. Fluorescence in situ hybridization as a diagnostic tool in malignant lymphomas. *Histochem Cell Biol*. 1997;108:391–402.
- Tinguely M, Frigerio S. Assessment of translocations in routine diagnostics of a surgical pathology unit. *Ther Umsch*. 2006;63:279–285.
- Cook JR. Paraffin section interphase fluorescence in situ hybridization in the diagnosis and classification of non-Hodgkin lymphomas. *Diagn Mol Pathol*. 2004;13:197–206.
- Petersen BL, Sørensen MC, Pedersen S, et al. Fluorescence in situ hybridization on formalin-fixed and paraffin-embedded tissue; optimizing the method. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2004;12:259–265.
- Ventura RA, Martin-Subero JI, Jones M, et al. FISH analysis for the detection of lymphoma-associated chromosomal abnormalities in routine paraffin-embedded tissue. *J Mol Diagn*. 2006;8:141–151.
- Haralambieva E, Kleiverda K, Mason DY, et al. Detection of three common translocation breakpoints in non-Hodgkin's lymphomas by fluorescence in situ hybridization on routine paraffin-embedded tissue sections. *J Pathol*. 2002;198:163–170.
- Paternoster SF, Brockman SR, McClure FR et al. A new method to extract nuclei from paraffin embedded tissue to study lymphomas using interphase fluorescence in situ hybridization. *Am J Pathol*. 2002;160:196–202.
- Remstein ED, Kurtin PJ, Buno I, et al. Diagnostic utility of fluorescence in situ hybridization in mantle-cell lymphoma. *Br J Haematol*. 2000;110:856–862.
- Reichard KK, Hall BK, Corn A, et al. Automated analysis of fluorescence in situ hybridization on fixed, paraffin-embedded whole tissue sections in B-cell lymphoma. *Mod Pathol*. 2006;19:1027–1033.
- Chin SF, Daigo Y, Huang HE, et al. A simple and reliable pretreatment protocol facilitates fluorescent in situ hybridization on tissue microarrays of paraffin wax embedded tumour samples. *Mol Pathol*. 2003;56:275–279.
- Watters AD, Bartlett JM. Fluorescence in situ hybridization in paraffin tissue sections: pretreatment protocol. *JM Mol Biotechnol*. 2002;21:217–220.
- Kan RK, Pleva CM, Hamilton TA, et al. Immunolocalization of MAP-2 in routinely formalin-fixed, paraffin-embedded guinea pig brain sections using microwave irradiation: a comparison of different combinations of antibody clones and antigen retrieval buffer solutions. *Microsc Microanal*. 2005;11:175–180.
- Plenat F, Montagne K, Weinbreck N. Molecular consequences of fixation and tissue processing: the examples of nucleic acids and proteins. *Ann Pathol*. 2006;26:8–21.
- Haralambieva E, Banham AH, Bastard C, et al. Detection by the fluorescence in situ hybridization technique of MYC translocations in paraffin-embedded lymphoma biopsy samples. *Br J Haematol*. 2003;121:49–56.
- Hirose Y, Masaki Y, Karasawa H, et al. Incidence of diffuse large B-cell lymphoma of germinal center B-cell origin in whole diffuse large B-cell lymphoma: tissue fluorescence in situ hybridization using *t*(14;18) compared with immunohistochemistry. *Int J Hematol*. 2005;81:48–57.
- Chen Z, Morgan R, Berger CS, et al. Application of fluorescence in situ hybridisation in haematological disorders. *Cancer Genet Cytogenet*. 1992;63:62–69.
- Richards SJ, Jacks AS. The development of integrated haemato-pathology laboratories: a new approach to the diagnosis of leukaemia and lymphoma. 2003;25:337–342.
- Kitayama Y, Igarashi H, Kozu T, et al. Repeated fluorescence in situ hybridization by a microwave-enhanced protocol. *Pathol Int*. 2006;56:490–493.
- Srinivasan M, Sedmak D, Jewll S. Effect of fixative and tissue processing on the content and integrity of nuclei acids. *Am J Pathol*. 2002;161:1961–1971.
- Adachi PL, Camparoto ML, Sakamoto-Hojo ET, et al. Fluorescent in situ hybridization in liver cell touch preparations from autopsy. *Pathol Res Pract*. 2005;201:41–47.
- Aubele M, Zitzelsberger H, Szucs S, et al. Comparative FISH analysis of numerical chromosome 7 abnormalities in 5-micron and 15-micron paraffin-embedded tissue sections from prostatic carcinoma. *Histochem Cell Biol*. 1997;107:121–126.
- Bagasra O, Harris T. In Situ PCR protocols. *Methods Mol Biol*. 2006;334:61–67.

6. Discusión

El estudio de las anomalías genético-moleculares en tumores, es importante tanto desde el punto de vista patogénico como diagnóstico, pronóstico y terapéutico. “*The World Health Organization*” (WHO) reconoce las alteraciones genéticas como uno de los criterios más fiables que ayudan a la clasificación de los linfomas. Realizar una correcta diferenciación de los linfomas, va a ser factor clave en el tratamiento y la supervivencia. Así por ejemplo, los MCL son de peor pronóstico y menor tiempo de supervivencia que los LF. Por ello es necesario desarrollar herramientas y técnicas fiables, sencillas y poco exigentes en cuanto a las condiciones de conservación tisular, de forma que se puedan realizar estudios tanto prospectivos como retrospectivos; técnicas que nos permitan diferenciar y clasificar estos tumores correctamente¹³⁴.

6.1. ASPECTOS METODOLÓGICOS DE LA TÉCNICA DE FISH EN EL MATERIAL HISTOLÓGICO DE RUTINA.

A principios de los años 90 se introdujo en los laboratorios de hematología la técnica HIS, aplicada en el seguimiento de las neoplasias malignas. Se trataba de una técnica complementaria a la citogenética convencional, con la gran ventaja que la HIS era capaz de detectar alteraciones cromosómicas que afectaban a regiones génicas muy pequeñas, incluso en núcleos en interfase. Esta técnica se vio mejorada con la aparición de sondas marcadas con fluorocromos: la FISH. Su uso pronto se popularizó para el estudio de las alteraciones cromosómicas, tanto en tejidos frescos como en sangre periférica, y se extendió como método de trabajo en los laboratorios de hematología^{135, 136}, convirtiendo la técnica de FISH en una herramienta fundamental para la clasificación y pronóstico de los LNH.¹³⁷

El desarrollo de la FISH, permite trabajar con distintos materiales, improntas de tejido fresco^{138, 139}, material congelado, sangre periférica, e incluso tejidos incluidos en parafina^{37, 140, 141}, permitiendo la posibilidad de estudiar series mucho más amplias, que conducirán a un conocimiento más preciso de la biología de los linfomas.

Mientras que el empleo de la FISH en tejido fresco está completamente estandarizado, su aplicación en material parafinados se ha visto restringida¹⁴², debido a que presenta numerosas dificultades técnicas^{37, 126, 127, 143}, y todavía es poco reproducible en la rutina diagnóstica. El principal problema, pasa por la obtención de señales demasiado

débiles o enmascaradas por una autofluorescencia de fondo que van a impedir la correcta interpretación de los resultados.

Se pueden reunir en dos grupos las dificultades de la técnica FISH. Por un lado las derivadas de factores inherentes al propio tejido (tejido inicial, edad de la muestra, inclusión en parafina, fijación) y por otro los debidos a la propia técnica (pretratamiento, digestión enzimática, temperatura, lavados). Todo esto va a interferir en la eficacia de la hibridación. Además, la interpretación de los cortes en tejidos parafinados es complicada y puede llevar a error, debido a que a veces puede existir una colocación de la señal producida por el azar o por la disposición de los cromosomas en los núcleos¹⁴⁴.

Para solventar estos problemas relacionados con la inclusión, fijación, e interpretación de los tejidos parafinados, se han propuesto algunos cambios de variación protocolaria en la técnica FISH, como son: el aislamiento de núcleos a partir de tejido parafinado^{139, 145, 146,32, 142, 146} o la extracción de los núcleos con aguja fina^{32, 142,147}. El objetivo de todos ellos es mejorar el método. Sin embargo nosotros consideramos que una de las principales ventajas de la FISH es poder trabajar con secciones finas de tejidos incluidos en parafina, ya que permite hacer una valoración de los linfomas en su propio contexto histológico. En esta técnica va a ser un factor fundamental, asegurarse que lo que estamos viendo son células tumorales para no dar falsos resultados. Un ejemplo muy significativo, son los linfomas *foliculares in situ* donde las células tumorales se encuentran confinadas en regiones muy pequeñas y sería muy fácil dar un diagnóstico erróneo si lo que estamos valorando no la hacemos *in situ*, tal y como pudimos comprobar en nuestros casos de linfoma folicular *in situ*. Realizar un análisis genético molecular en su contexto histológico nos permite correlacionar lo que vemos en la FISH con la Hematoxilina-Eosina, y analizar subpoblaciones del tumor.

Consideramos que lo ideal es mejorar el rendimiento de la FISH sobre cortes finos de material parafinado. Para ello hay que tener en cuenta todos los factores que pueden intervenir a la hora de conseguir resultados. óptimos

Establecer el espesor del corte más adecuado ha sido un aspecto muy debatido en la literatura^{124, 125, 142, 143}. Los primeros estudios revelaban que había diferencias en los resultados al realizar un corte a 15-20µm o a 5-6µm. En cortes demasiado finos podríamos estar seccionando alguna de las señales de hibridación al seccionar parte de la arquitectura

celular^{124, 125}, constituyendo un problema, sobre todo si buscamos amplificaciones o duplicaciones de genes. Prueba de ello es que podríamos observar hasta 8 patrones artefactuosos de diferentes señales según dónde coincida el corte celular¹⁴⁸. Por otro lado, cortes demasiado gruesos exigen un pretratamiento más agresivo que daña la morfología y un procesamiento de la muestra mucho más largo, además requieren una mayor cantidad de tejido. Otra desventaja es que requieren tecnología más avanzada, como por ejemplo microscopía confocal¹⁴⁹, que permite hacer el solapamiento de los distintos planos, y de la que no se dispone en todos los laboratorios de Anatomía Patológica. De nuestra experiencia, concluimos que es mejor trabajar con secciones finas, ya que lo que estamos analizando son translocaciones recíprocas. La interpretación se realizará valorando sólo los núcleos intactos, aunque se hayan seccionado algunas células.

Teóricamente obtendríamos una mayor información si observamos todos los patrones con las diferentes señales de los núcleos³⁷, pero la confusión que implica esto es mucho mayor que los datos que pueda aportar en el estudio de translocaciones para la rutina diagnóstica.

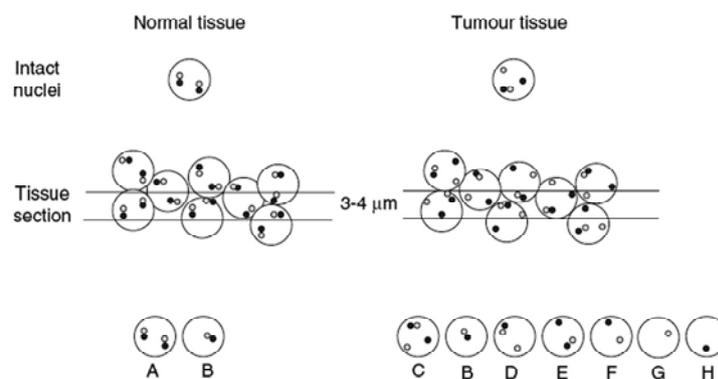


Fig 35. Análisis de las distintas posibles secciones de cortes en tejido parafinado³⁷.

El siguiente problema que plantea esta técnica, es la elección del pretratamiento más eficaz para desenmascarar la secuencia diana de los ácidos nucleicos antes de la hibridación. Lees et al¹⁵⁰ demostraron que en tejidos parafinados, lavados a altas temperaturas (80°C) con Ác Cítrico durante 2 horas, seguido de la digestión con enzimas proteolíticas mejoraba la accesibilidad de la sonda a su secuencia diana. Las altas temperaturas y el ambiente ácido ayudaban a eliminar las proteínas unidas al ADN, dejando la secuencia al descubierto. Desde entonces se ha debatido cuáles son las soluciones y temperaturas más eficaces^{123, 131}.

Las soluciones comúnmente empleadas en el estudio de translocaciones son NaSCN (Tiocianato Sódico), T-E (TRIS/EDTA), Citrato Sódico y Ác Cítrico^{37, 64, 151, 152, 153-155}. Pero no existe un acuerdo con los tiempos ni con las temperaturas a las que se deben utilizar. Chin S-F et al¹²³ afirmaron que tiene mayor eficacia el Ác Cítrico (bien sea induciendo el calor con olla a presión o con microondas) frente al NaSCN, y además evita un mayor desprendimiento de los tejidos en los *tissue array*. Nuestros resultados muestran que cualquiera de los pretratamientos empleados va a conseguir una eficacia similar, y que el desprendimiento del tejido del *tissue array* es problema de cómo la muestra se fija al cristal y no depende del pretratamiento utilizado.

La temperatura a la que se deben emplear estas soluciones también va a variar según los diferentes autores, los rangos recomendados van desde los 45°C¹⁵⁶ a 85°C^{30, 64, 157}, aunque la mayoría se inclinan por temperaturas más elevadas (85°C). El método de calentamiento para alcanzar la temperatura deseada también es diferente, los más comunes son baño maría, olla a presión, o microondas¹³¹. Tampoco existe un acuerdo entre los tiempos recomendados de permanencia en las soluciones de lavado, que varían desde los 10 hasta los 30 min.

En lo que sí parece haber acuerdo es que cuando la señal es demasiado débil se debe aumentar la temperatura o los tiempos de pretratamiento¹³¹.

En nuestra opinión, la temperatura es un factor clave para la obtención de buenos resultados, independientemente del tipo de pretratamiento. La temperatura ideal es 99°C durante 10 min, seguido de 15 minutos a temperatura ambiente y, como otros autores, recomendamos el uso del microondas (para intensificar la señal obtenida)^{158, 159}. Lo que

además asegura que la muestra va a mantenerse todo el tiempo a la temperatura deseada, sin oscilaciones.

Otro paso fundamental en la técnica de FISH es definir la concentración y tiempo de las proteasas ^{160, 161}. Las enzimas de digestión más usadas en la literatura son la proteinasa K y la pepsina y los tiempos recomendados varían entre los 10 y 30 minutos.^{37, 61, 131, 153, 162}. Se trata de un paso delicado puesto que tiempos de digestión insuficientes generaran señales deficientes y tiempos de digestión demasiado largos originan los denominados “núcleos fantasmas”, con pérdida de señal.

El tiempo de digestión se va a correlacionar directamente con el tiempo de fijación previo de la muestra. Se demostró que una fijación excesiva reducía la señal de hibridación¹²⁶, y que esto debería ser compensado con un pretratamiento más largo¹⁶³ tal y como ocurre en las técnicas de inmunohistoquímica¹⁶⁴. En la literatura recomiendan que como los tiempos de fijación son variables entre muestras, en el caso de no obtener una buena hibridación repetir todo el proceso alargando los tiempos de digestión¹⁶⁵. Nosotros consideramos que esto supone un consumo de tiempo excesivo para ser aplicado en las muestras de rutina. Otra propuesta es realizar varios cortes de un mismo tejido y aplicar diferentes tiempos de pretratamiento, lo que implica un gasto de material extra innecesario. Estos datos daban una idea de la importancia de la digestión en todo el proceso, y de la necesidad de poder preestablecer el tiempo de digestión de cada muestra. Nuestra propuesta¹⁶⁶ es la de monitorizar y controlar la digestión observando al microscopio óptico la morfología que va adquiriendo el tejido deteniendo la digestión cuando el tejido adquiere forma de “helecho”. Esta técnica va a solventar no sólo los problemas derivados de la fijación sino los problemas debidos al grosor del corte y el tipo y concentración de enzima utilizada.

6.1.1. VISUALIZACIÓN E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS.

La visualización de las señales de hibridación requiere de patrones bien preestablecidos y de fijar unas directrices similares para todos los casos.

Para a una buena visualización de la imagen, lo primero es tratar de visualizar las señales en todos los planos posibles, es muy importante mover el micrométrico mientras

estamos haciendo la valoración, puesto que la célula es tridimensional y en el microscopio vemos un único plano.

También es fundamental asegurarse de las horas de uso de la lámpara de fluorescencia, a veces la obtención de señales débiles no se deben a problemas técnicos sino a que lámpara tiene demasiadas horas de uso.

Para evaluar los resultados lo primero que se debe tener en cuenta es qué regiones se van a valorar. Si se encuentran zonas tisulares dónde las células están muy apelmazadas, zonas muy densas, zonas sobredigeridas o con una pobre hibridación, esos resultados deben de ser ignorados. Siempre hay que trabajar en regiones donde las señales sean interpretables. Es inevitable que aparezcan núcleos seccionados, regiones donde por azar se hayan solapado dos células o las señales coincidan en el mismo plano de foco, obteniendo resultados alterados. Por lo general si tenemos conocimiento de que existe tejido tumoral en los bordes de la muestra, es mejor cuantificar las señales de los núcleos en el tejido de la periferia, donde no suele haber tanto solapamiento¹⁴³.

Para calcular el nivel de corte o número de señales a partir de las cuáles podemos considerar la translocación como positiva, se utilizó la fórmula estadística descrita por Haralambieva^{37, 143}. Este fue definido en base al ratio de falsos positivos obtenidos en 15 amígdalas reactivas. En nuestro caso los falsos positivos fueron de un 6% *sondas split* y de un 19% en *sondas dual fusion*. Los valores encontrados en la literatura son también variables, rondan entre 3- 13%^{143, 167} según la sonda y tejido empleado. Este valor no es unánime pero, por norma general, cuando está presente la translocación somos capaces de visualizarla en la mayoría de las células tumorales, por lo que estas diferencias del 3 al 20% no son importantes cuando examinemos un gran número de células.

La recomendación es que la valoración por muestra se haga sobre 100 núcleos en interfase. Resultados obtenidos contabilizando un mayor número de núcleos de forma automatizada¹⁶⁸ llegaron a cifras similares de corte que contando 100 núcleos. Nosotros hemos valorado 100 y 200 núcleos y los resultados fueron similares en cuanto a los niveles de corte.

Optimizando todos estos parámetros se conseguirá aplicar en las muestras parafinadas la técnica de FISH en la rutina diagnóstica con un 100% de éxito, lo que

supone una gran ventaja ya que el material parafinado es la mayor fuente de trabajo en los laboratorios de Anatomía Patológica.

6.1.2. ELECCIÓN DE LA SONDA.

Otro problema que se plantea, independientemente de los aspectos técnicos, pasa por la elección del tipo de sonda. Como ya hemos descrito existen dos tipos de sonda indicados para el estudio de las translocaciones. Escoger la más adecuada según lo que queremos detectar evitará también la aparición de falsos resultados.

Las sondas de *split* son muy útiles para el estudio de translocaciones en los casos en la que los genes diana presentan múltiples posibles parejas cromosómicas, como ocurre con *MYC*, *BCL6* o *ALK*. Las sondas de *dual fusion*, cuando existe un patrón alternativo a la translocación de estudio no va a ser detectado, originando falsos negativos. Para evitar esto habría que realizar varios FISH con sondas *dual fusion* específicas para cada uno de los posibles *partners*.

En cuanto a la interpretación, las sondas *split* van a evitar muchos más falsos positivos por azar³⁷ respecto a las de separación, debido a la estrategia que siguen para su detección. Además a la hora de interpretar núcleos artefactados o con señales débiles, en los ensayos de separación, es más fácil de reconocer las señales¹⁴³, tal y como muestran nuestros resultados en la Fig 31.

Por otro lado, las sondas de fusión ofrecen una información más precisa, ya que nos indican con qué pareja génica se va a translocar el gen de estudio, esto puede ser útil a nivel de conocimiento molecular y justificar si existe una relación entre la translocación y la sobreexpresión de la proteína. Además, estas sondas van a permitir diferenciar entre euploidías y aneuploidías, ya que marcan dos genes en diferentes cromosomas. Otra ventaja es que los filtros comerciales son más apropiados para este tipo de sondas.

La estrategia que emplean las sondas de *dual fusion* intenta reducir el número de posibles falsos positivos por colocación azarosa de una señal que generan las sondas *single fusion*. En las *dual fusion* al tener que ver dos señales fusionadas para considerar positivo, se reducen los falsos positivos. En teoría esta estrategia acercaría los niveles de corte entre sondas *split* y *dual fusion*. Aunque esto no va a ser del todo cierto en la práctica,

porque no siempre va estar presente la doble señal de fusión, como por ejemplo si hay deleción del cromosoma derivativo, con núcleos truncados o si se secciona una de las señales al cortar el tejido, se estima que estos artefactos ocurren con una frecuencia del 5-10% en las células y hay que tenerlo en cuenta a la hora del análisis. Así, por ejemplo, encontrar una única señal es muy común en LBCG con las sondas *dual fusion*. Por lo que para establecer los niveles de corte hemos tenido que considerar como positivo células con una única señal de fusión, lo que justifica que nuestros niveles de corte sean mucho más altos en las sondas *dual fusion* (20%) frente a las sondas *splits* (6%).

De nuestra experiencia podemos concluir que las sondas de *split* en el estudio de las translocaciones cubren un espectro más amplio, son más fáciles de interpretar cuando la muestra tiene mucha autofluorescencia y reducen el número de falsos positivos. Por ello parecen las más adecuadas para este tipo de estudios. Siempre teniendo la idea de que es posible combinar ambas estrategias o utilizar una u otra sonda dependiendo de la información que nos interese obtener.

6.2. ESTUDIO COMPARATIVO FISH-PCR PARA DETECCIÓN DE LAS TRANSLOCACIONES.

El diagnóstico de translocaciones por técnicas de PCR se basa en la detección mediante la amplificación de secuencias de ADN que, en condiciones normales, no se haya en continuidad. Este proceso se lleva a cabo utilizando cebadores diseñados para que se unan a ambos lados de los puntos de fusión de estas secuencias que la translocación ha combinado. Se trata de una técnica molecular que mide una alteración puntual, por lo que no se debe basar un diagnóstico de linfomas de manera exclusiva en esta técnica.

Durante los años 90, la PCR fue utilizada con gran éxito en la detección de $t(11;14)(q13;q32)$ y $t(14;18)(q32;q21)$ ¹⁶⁹⁻¹⁷³, por sus múltiples ventajas. Es una técnica muy sencilla, sensible, rápida, altamente reproducible y su manejo está muy estandarizado en todos los laboratorio, aunque al igual que la FISH su índice de detección se ve reducido por la calidad del ADN de partida^{141, 174}.

Se ha demostrado que la fijación con formol disminuye el rendimiento de la amplificación por PCR¹¹⁸. Como ya hemos mencionado, para la inclusión de tejidos

parafinados es imprescindible un paso previo en formol, donde el ADN forma numerosos enlaces cruzados⁵⁸ que impiden la amplificación de fragmentos grandes. La primera limitación de esta técnica es que en tejidos parafinados el tamaño de amplificación de los fragmentos estará entre los 200-500pb.

Para la obtención de buenos resultados mediante la técnica de PCR es fundamental la forma en la que se presenta el material de partida. Así, por ejemplo, diversos estudios citan un 100% de éxito de esta técnica en tejido fresco o congelado y del 70 al 40% en muestras incluidas en parafina^{170, 174}. Nuestros datos son algo más alentadores pero tampoco fuimos capaces de obtener amplificación en 2LF y 1LCM. Se trata de una limitación que no deriva de la técnica, sino del material de partida, de la calidad del ADN que debe ser íntegro necesariamente en toda la pauta de lectura.

En la FISH también hay diferencias según el material de estudio sea tejido congelado o parafinado. Aunque estas no van a ser tan significativas, está descrito que el éxito con material congelado es del 100% y en parafinado del 80%⁵⁸. Sin embargo el éxito para nuestras muestras fue del 100%.

Es decir, que partiendo del mismo material de trabajo (muestras incluidas en parafina) tanto para la FISH como para la PCR, hemos encontrado diferencias en el éxito de ejecución de ambas técnicas para el estudio de los dímeros de fusión. La FISH se pudo valorar en todas las muestras, mientras que para la técnica de PCR hubo 3 muestras (2 LF y 1 LCM) que no se pudieron valorar. Esto demuestra que la técnica de FISH no va a ser tan exigente en la calidad del ADN de partida como la PCR.

También hemos encontrado diferencias en la sensibilidad de los resultados. Obtuvimos un 34.5% más de resultados positivos por FISH para la t(14;18)(q32;q21) y un 36.7% más de resultados positivos por FISH para la t(11;14)(q13;q32).

Estos resultados se justifican debido a que cuando se genera el dímero *BCL2-IGH* como consecuencia de la t(14;18)(q32;q21) su tamaño puede ser muy variable desde los 80 a los 1500pb, por dos razones fundamentales:

- Los puntos de rotura para el locus de *BCL2* van a ser variables. Si los puntos se localizan en la región MBR y 3'MBR (frecuencia del 70%) el dímero que se origina en la translocación tiene un tamaño 100 a 275pb, lo que permite ser

detectado por PCR. Pero si lo hacen en la región mcr (frecuencia del 20%) el segmento resultante de la translocación *BCL2-JH* varía entre 350-1000 pb, así que habrá dímeros donde la PCR de falsos negativos. Si lo hacen en icr, 3' *BCL2*, o 5' mcr se sitúan de forman muy variada y no van a ser detectados por PCR.

- La variación en el tamaño del dímero JH. En LF es característico que las regiones de JH sufran mutaciones somáticas en curso, añadiendo nucleótidos a la región J que aumentan el tamaño del fragmento, además originan cambios en su secuencia haciendo que estos fragmentos no sean reconocidos por los cebadores de la PCR.¹⁴¹

Al existir tantos puntos diferentes de rotura, para evitar falsos negativos deberemos analizar todas las regiones. La FISH tiene capacidad de analizarlos todos, mientras que la PCR aunque intenta desarrollar estrategias que traten de combinar estos puntos no es capaz de analizarlos todos.

En el estudio de *CCND1-IGH* los resultados descritos son parecidos, sólo que los puntos de rotura todavía son más variables lo que explica que hayamos encontrado todavía un porcentaje mayor de falsos negativos en la técnica de PCR frente al FISH que para el reordenamiento *IGH-BCL2*. El 80% de los puntos de rotura se extienden por un área que abarca entre 15 y 400kb, esto representa un fragmento demasiado grande para los cebadores de la PCR que no cubrirán ni el 50% de esos puntos¹⁷⁵.

Al igual que ocurría con el dímero *IGH-BCL2*, el análisis de un mayor número de puntos de rotura reducirá el número de falsos negativos. Así, por ejemplo, se ha descrito en la literatura que si sólo analizaremos los MTC con técnicas de PCR obtendremos entre un 60-70 % de falsos negativos y si analizáramos MTC+mMtc un 50% de falsos negativos. Por ello es necesario estudiar un mayor número de regiones. Por el contrario nuestros análisis de la región de mMTC no aportaron ninguna positividad añadida.

En resumen, las diferencias entre los ratios de detección positivos existentes entre el FISH y la PCR encontradas en nuestros datos pueden justificarse por las limitaciones específicas de cada método¹⁴⁷. La PCR tiene la escasa aplicabilidad cuando hay variabilidad en los puntos de rotura, los cebadores de la PCR requieren secuencias absolutamente complementarias para la detección de la translocación y sólo se unen a la región a la que van dirigida. Las sondas de FISH tienen un mayor tamaño, se extienden a

lo largo de toda la región de estudio y cubren todos los posibles puntos de rotura, además no necesitan ser totalmente homólogas para unirse a la región de interés.

Independientemente de los aspectos técnicos existen otras desventajas de la PCR frente a la FISH.

La PCR no puede correlacionar las alteraciones genéticas con determinadas poblaciones celulares en el tejido de estudio. Además ofrece una información más escasa limitándose a detectar presencia o ausencia de la translocación. La técnica de FISH permite valorar si existe un patrón de translocación complejo, independientemente de estudiar la señal de colocación, estas mismas valen para detectar otras anomalías genéticas tales como deleciones o amplificaciones. Por último, el estudio de las translocaciones mediante PCR no va a poder estar disponible en muchas de las translocaciones genéticas, ya que la PCR amplifica una alteración puntual, no puede examinar miles de genes. Sólo podemos estudiar aquellas translocaciones en las que conozcamos el *partner* con el que se va a translocar. Por eso, la mayoría de los autores detectan por PCR los dímeros CCND1-IGH ó BCL2-IGH pero tanto la *CCND1* como *BCL2* van a tener otros *partners* reconocidos tales como los genes que codifican para las cadenas ligeras de Ig. Cuando esto sucede obtendríamos de nuevo falsos negativos, la solución pasaría por usar cebadores específicos que reconozcan *IgLκ*, *IgLλ*. En este sentido la PCR nos daría la misma información que las sondas de fusión.

Pese a los diferentes esfuerzos hechos para mejorar las técnica de PCR^{58, 115}, basados en la aparición de cebadores que reconocen nuevos y más puntos de rotura, siguen siendo más eficientes las sondas de FISH^{116, 176}.

Los datos obtenidos en nuestro estudio coinciden con otros estudios, en los que se afirma la superioridad de la técnica de FISH frente a la PCR^{58, 61, 116, 147, 174, 176, 176, 177}.

Hasta ahora se había recomendado utilizar las técnicas de FISH combinadas con PCR⁵⁸, o utilizar la PCR como técnica de cribado y hacer sólo por FISH los casos que salen negativos por PCR¹⁴⁷, debido a que la FISH es una técnica más cara y las dos técnicas conjuntas pueden aumentar la sensibilidad¹⁷⁸. Sin embargo, nosotros creemos que ya existen suficientes datos que demuestran que el porcentaje de éxito en tejido parafinado de la técnica FISH es mucho mayor que el de la PCR, siendo además la FISH una técnica mucho más específica y donde es muy difícil que se produzcan resultados erróneos. Por

todo ello postulamos que debería ser la técnica preferentemente empleada para el estudio de las translocaciones en el diagnóstico de linfomas de Anatomía Patológica.

6.3. LINFOMA FOLICULAR:

6.3.1. DETECCIÓN DEL DÍMERO BCL2-IGH Y REORDENAMIENTO DE *BCL6* MEDIANTE FISH. RELACIÓN ENTRE LA $t(14;18)(q32;q21)$, REORDENAMIENTO DE *BCL6* Y GRADO HISTOLÓGICO EN LF.

Los LF son neoplasias caracterizadas por un patrón histológico que contiene la arquitectura y las características citológicas del centro germinal, comprendiendo una gran variedad de centrocitos y centroblastos. Según la proporción de centroblastos se distinguen 3 categorías: grado I, grado II, grado III. Las 2 primeras entidades son consideradas como LF de bajo grado. Mientras que los LF grado III son denominados de alto grado. Estos últimos se subdividen en grado IIIa (con centrocitos) y grado IIIb (sin centrocitos) considerados de alto grado y como una categoría no homogénea del tumor¹⁰.

Nuestros resultados, al igual que lo descrito en la literatura, encuentran una mayor incidencia de la $t(14;18)(q32;q21)$ para linfomas foliculares de grado I y II. Esto puede justificarse porque la expresión de BCL2 bloquea la muerte celular¹⁷⁹ manteniendo la viabilidad de las células. Además conduce a la acumulación celular de las formas iniciales tumorales que llevan dicha translocación, más que a la evolución del tumor con la consiguiente adquisición de nuevas alteraciones, que sería más propio de fases más avanzadas¹⁸⁰.

Las frecuencias obtenidas para la $t(14;18)(q32;q21)$, son iguales entre los grados I y II, ambos del 73%, sugiriendo que no existen diferencias moleculares entre estos dos subtipos de linfoma y que quizás puedan ser diagnosticados como una única entidad agrupada en linfomas de bajo grado. Este 73% es un valor un poco más bajo de lo referenciado para la población Europea (entorno al 85-90%¹⁸¹⁻¹⁸⁴), sobre todo cuando nos referimos a los linfomas de bajo grado.

En cuanto a la incidencia de la translocación de *BCL2* en el estudio de linfomas foliculares independientemente del grado, ésta fue aun más baja (66%). En este caso nuestras frecuencias coinciden más con las de la población China descritas por Loke¹⁸⁵,

Chen¹⁸⁶, Sekiguchi et al¹⁵⁸ que atribuían la baja incidencia de la translocación a una distribución poblacional, siendo más alta en Europa y América y más baja en Asia¹⁸⁷. Sin embargo nosotros presentamos frecuencias parecidas indicando que posiblemente la translocación no va a depender de la localización geográfica.

La transformación histológica de linfomas foliculares de bajo a grado alto grado durante el curso clínico, suele estar presente entre el 60% al 80% de los pacientes. Los eventos que conducen a esta transformación aun no se comprenden bien, y el *background* biológico de los linfomas de grado III está pobremente entendido. Aun así, se definen como entidades más agresivas y de peor pronóstico y deberán ser tratadas de acuerdo con esto^{188, 189}.

La WHO recomienda la subdivisión de los linfomas de grado III basándose en diferencias biológicas y morfológicas, haciendo distinción entre grado IIIa y IIIb¹⁰. Las principales diferencias que intentan establecer hacen referencia a que los LF de grado IIIa presentan una proporción de centrocitocitos, además de la t(14;18)(q32;q21) en un porcentaje de 60% y tienen más características en común con los linfomas de grado I y II. En cambio los LF de grado IIIb están compuestos únicamente por centroblastos y sólo un 13% de ellos tienen la t(14;18)(q32;q21), teniendo más características en común con los LBCG¹⁹⁰. En contraste a esta baja frecuencia del reordenamiento de BCL2, presenta reordenamiento del gen *BCL6*.

Nuestros datos, no muestran estas variaciones citogenéticas entre el grado IIIa y IIIb. Es más son contradictorios con lo citado por algunos autores^{10, 11, 191}. La frecuencia para la t(14;18)(q32;q21) en linfomas de grado IIIa fue del 16%, distando mucho del 60% referenciado en la literatura, la razón podría deberse al bajo número de casos analizados (tan sólo 6). Por otra parte en los linfomas de grado IIIb encontramos un 55% de positividad (en 9 casos analizados) para el dímero de *BCL2-IGH*, un valor muy alto con respecto al 13% encontrado en la literatura. Además la frecuencia del dímero de *BCL6* es más o menos igual para los dos grupos (30-40%), incluso algo mayor en los de grado IIIa (40%). Estos datos nos hacen pensar y siempre con precaución, debido a la baja serie analizada, que no existe una gran diferencia a nivel molecular entre los linfomas de grado IIIa y IIIb. Este hecho nos ayudaría a justificar que entre ambos subgrupos no se hayan encontrado diferencias que afecten a la supervivencia o al tiempo libre de enfermedad¹⁹².

Aunque se ha postulado que los grados IIIa y IIIb tienen características citomorfológicas, inmunohistoquímicas y citogenéticas diferentes, la bibliografía no ha sido capaz de evidenciar la implicación en la respuesta al tratamiento o la mayor supervivencia de una entidad respecto a otra, ya que ambos grados se comportan igual. En donde sí se encuentran estas diferencias es en el curso clínico de los linfomas de alto grado (IIIa y IIIb) respecto a los LF de bajo grado (I y II).

La frecuencia del reordenamiento del gen de *BCL6* en linfomas de grado I y II, en nuestro estudio han sido muy bajas, sólo del 3%, y como peculiaridad se manifestaban paralelamente con el dímero *IGH-BCL2*. Lo cual refuerza la teoría de que la alteración de *BCL6* se adquiere también en etapas tempranas de la evolución histológica, como afirmaron Keller et al¹⁰³, y no es exclusivo de la etapa de diferenciación de isotipos en el CG. Además demuestra que la alteración del *BCL6* en linfomas de bajo grado se adquiere consecuentemente como una alteración secundaria, gracias al alargamiento de la vida celular provocada por la expresión de *BCL2*. Alteraciones secundarias que sumadas a las primarias se podrían relacionar con la progresión del tumor¹⁰, de hecho se cree que la existencia de esta mutación juega un papel importante en la transformación de LF a LBCG¹⁹³. Pero no hay una opinión unánime en este tema ya que otros estudios no encuentran aceleración en la progresión de la enfermedad⁹⁷ y la presencia del reordenamiento de *BCL6*.

Nuestros datos han mostrado la alteración de la región 3q27 en el 40 y 33% de los linfomas de grado IIIa y IIIb respectivamente, siendo estos negativos para la *t(14;18)(q32;q21)* (a excepción de un caso en que hemos encontrado doble reordenamiento). Esto evidencia que la alteración de *BCL6* puede surgir en este grado de linfoma como una alteración primaria. Ambas alteraciones *BCL2* y *BCL6* surgirán como eventos primarios aislados y se cree que están relacionadas con las diferentes vías de transformación del tumor¹⁰. En el caso de los LF IIIa la presencia de la alteración de *BCL6* se cree que tiene que ver con la progresión del tumor a LBCG. Sin embargo en los LF IIB se ha demostrado que el punto de rotura que conlleva a la alteración del gen de *BCL6* se produce en región de ABR, mientras que en los LBCG el punto de rotura se localizará en la región MBR¹², por lo tanto no habría una progresión de los LF IIIb a LBCG.

La frecuencia 33-40% de muestras reordenadas para *BCL6*, no se puede considerar muy alta con respecto a lo citado en la bibliografía (50%). Esta diferencia se puede

justificar porque nuestros datos son únicamente referidos a la translocación del gen de *BCL6* y esta no es la única alteración por la cual la proteína va a ser sobreexpresada, ya que existen otros mecanismos como amplificación de la región la 3q27 o hipermutaciones que provocan la sobreexpresión de *BCL6*¹⁹⁴.

En resumen, podemos hablar de dos grupos de linfomas claramente diferenciados por sus características genéticas: los de bajo grado, caracterizados por estar presente el dímero de IGH-BCL2 y los de alto grado, caracterizados por el reordenamiento de *BCL6*.

6.3.2. TRANSLOCACIONES Y EXPRESIÓN PROTEICA.

La detección de BCL2 mediante técnicas de inmunohistoquímica es de gran ayuda en el diagnóstico de LF, el patrón de sobreexpresión que presenta en los núcleos permite distinguir centros germinales de centros reactivos¹⁹⁵. La expresión alterada de la proteína BCL2 se encuentra en el 90% de los LF.

Aunque en un principio se sugirió que la t(14;18)(q32;q21) era la única causante directa de la expresión de BCL2 en estas neoplasias^{41, 196} se ha visto que no es así^{64, 197}. Existe un porcentaje de casos de LF que tienen sobreexpresión de la proteína y sin embargo no presentan la translocación. En nuestro caso, la proteína BCL2 se expresaba en el 90% de los casos mientras que la translocación sólo era positiva en el 66%. Estos resultados implican la existencia de otros mecanismos moleculares que pueden ser responsables de la desregulación y consiguiente sobreexpresión de BCL-2:

- Anomalías del cromosoma 18: la existencia de una copia extra del cromosoma 18¹⁹⁸ o la amplificación del gen de BCL2, que se aparecen en un porcentaje similar al de la translocación¹⁹⁹.
- Interacciones con otros miembros de la familia de BCL2²⁰⁰.

Además la translocación también podría estar enmascarada por complejos reordenamientos crípticos²⁰¹.

Otro motivo que puede justificar ausencia de la translocación pero la sobreexpresión de la proteína, es que la translocación pase desapercibida porque existe una variación muy grande de los puntos de rotura¹¹⁷, pasando desapercibidos.

Incluso se ha sugerido que los casos con t(14;18)(q32;q21) negativos y con expresión de BCL2 merecen ser considerados como otro subgrupo¹⁷, aunque la implicación pronóstica no está muy bien conocida^{130, 202}. De nuestro estudio, 17 casos pertenecerían a este grupo.

Otro grupo diferenciado sería el que presenta la t(14;18)(q32;q21) y expresa BCL2. En la literatura estos casos se asocian por lo general con un mejor pronóstico^{203, 204}, aunque existen autores que afirman que representa un peor curso clínico²⁰⁴. Esta contrariedad se puede deber a que el punto de rotura donde ocurre dicha translocación podría influir en el pronóstico¹³⁰.

En nuestro estudio hemos encontrado un caso donde no hay translocación ni expresión de BCL2. En un principio se sugirió que estos casos con ausencia de translocación y expresión de BCL2 representaban un subtipo de enfermedad de peor pronóstico con características clínicas más agresivas, y deberían ser clasificados como otra entidad. Pero existen muy pocos en la literatura como replantearla clasificación.

Otros dos casos donde a pesar de que la expresión de BCL2 era muy débil, sí había translocación. Este hallazgo lo podemos relacionar con los casos donde está presente la t(14;18)(q32;q21) pero no hay sobreexpresión de BCL-2⁴⁴. Este fenómeno podría deberse a que *BCL2* puede sufrir otras mutaciones somáticas que originan cambios en la secuencia aminoácidica de la región del epitopo que es reconocida por el anticuerpo. En realidad sí existe expresión de BCL2 pero no es reconocida por el anticuerpo, serían pues falsos negativos para BCL2⁴⁴. Todavía se desconoce su importancia clínica.

La presencia o ausencia conjunta de la translocación y estudio inmunohistoquímico puede ser muy útil para diferenciar grupos de LF que permitan monitorizar la progresión de la enfermedad⁶¹.

6.4. LINFOMA DE CÉLULAS DEL MANTO:

6.4.1. DETECCIÓN DEL DÍMERO CCND1-IGH MEDIANTE FISH.

La t(11;14)(q13;q32) fue detectada en el 100% de nuestros casos, poniendo de manifiesto que es un marcador clave para confirmar el diagnóstico de estos linfomas.

Incluso hay casos en la literatura donde la presencia del dímero *IGH-CCND1* ha servido para confirmar el diagnóstico de LCM con un inmunofenotipo raro²⁰⁵.

La *CCND1-IGH* funciona como un oncogén aunque las habilidades para la transformación y la formación del tumor son menos potentes que las de un oncogén. Ratones transgénicos para la *CCND1* no eran capaces de desarrollar espontáneamente linfomas y necesitaban la cooperación de otros oncogenes alterados como *MYC*⁸⁵ para poder desarrollarlos. A menudo la *t(11;14)(q13;q32)* puede ser detectada en células sanguíneas normales, esto refuerza la hipótesis de que se necesitan otros mecanismo para poder desarrollar el tumor, además es un reflejo de que la técnica de FISH debe ser integrada dentro del contexto clínico de cada paciente, entendiendo sus resultados como tal.

La *t(11;14)(q13;q32)* no es la única alteración encontrada en los LCM²⁰⁶ ya que se han descrito múltiples inestabilidades cromosómicas que surgen como eventos secundarios, pero sí que es la única común que se puede utilizar para su diagnóstico.

6.4.2. TRANSLOCACIONES Y EXPRESIÓN PROTEICA.

En lo referente a la expresión de la *CCND1* en LCM podemos decir que existe una muy buena correlación entre la sobreexpresión de la *CCND1* y la existencia de la translocación como ya quedara patente en otros estudios²⁰⁷. Ha sido descrito algún caso donde había expresión de *CCND1* y ausencia de translocación, aunque esto es muy raro²⁰⁸. En algunos casos lo atribuyen a que el análisis se hizo en cultivos celulares donde evolucionaron las células normales en vez de las tumorales²⁰⁹. En nuestra serie no hemos encontrado ningún caso con estas características. La translocación estaba presente en el 100% de los casos y coincidían con la sobreexpresión de la *CCND1*, a excepción de un caso dónde estaba presente la translocación pero no había expresión de *CCND1* esto se puede ser explicado por una mutación en la región del epitopo que es la que reconoce al anticuerpo, al igual que sucedía con *BCL2*, otro motivo tendría que ver con problemas derivados de una mala fijación que alterase la proteína.

En un principio se creía que la sobreexpresión de ciclina D1 era imprescindible para el desarrollo de la patogénesis de LCM, sin embargo en la literatura se ha descrito

casos de células tumorales que no expresan CCND1 ni tampoco la translocación (aunque no son muy abundantes). En un primer momento se atribuyó a un error diagnóstico, a un inadecuado análisis genético o a una mala inmunohistoquímica. Estas sospechas quedaron desechadas tras el empleo de técnicas más sensibles como la RT-PCR o cADN *microarrays*²¹⁰ y vio que había casos de LCM que no expresaban CCND1. Yatabe Y. et al²¹¹ consideran que estos casos con CCND1 negativa representan una entidad diferente y que deberían ser clasificados en grupos distintos, debido a que los casos CCND1+, tienen un curso clínico más agresivo²¹¹.

Kai Fu et al²¹² observaron en reducido número de pacientes con morfología y características genéticas de LCM que carecían de expresión de ciclina D1 y t(11;14), pero en su lugar sobreexpresaban CCND2 (ciclina D2) CCND3 (ciclina D3). La sobreexpresión no se debía a amplificaciones o translocaciones en los genes CCND2 Y CCND3, y clínicamente los pacientes se comportaban como los casos CCND1 positivos. En conclusión, la desregulación de CD2 y CD3 provoca el mismo efecto que la de la CCND1. Esto vuelve a justificar la estrecha relación entre la desregulación de las ciclinas y la aparición del tumor, convirtiendo a las ciclinas en marcadores de LCM.

A pesar de que existe algún caso aislado descrito en la literatura de ausencia de translocación en CCND1 y linfoma del manto, podemos decir que la translocación y la sobreexpresión de la ciclina D1 es un método sensible y fiable para la detección de linfoma del manto^{30, 213}. Como marcador de supervivencia, los casos con CCND1 presentan mejor pronóstico aunque hay que tener en cuenta que existen otros factores como son las deleciones o ganancias cromosómicas que afectan a la supervivencia de LCM²¹⁴.

6.5. LINFOMA B DIFUSOS CÉLULAS GRANDES.

6.5.1. DETECCIÓN DE LOS REORDENAMIENTOS DE BCL2, BCL6 Y MYC.

Los LBCG son considerados como una entidad definida en la clasificación de la WHO, pero su presentación clínica, morfológica, genética y molecular sugiere que estos tumores representan a un grupo heterogéneo de neoplasias³⁴. Se trata del grupo más frecuente perteneciente a los LNH, por lo que es muy útil ampliar los conocimientos sobre su comportamiento. En la actualidad se han definido varias subcategorías de estos tumores.

Entre ellas encontramos los LBCG que pueden surgir *de Novo* (referidas a las formaciones primarias) aquellos que representan la progresión y transformación de un tumor previo menos agresivo como el linfoma folicular (referidos como secundarios)³⁴. Otra clasificación hace referencia a su ubicación ganglionar (con nódulos linfáticos involucrados) o extraganglionar (Médula ósea, tracto intestinal, hígado, tejido, piel, ovario, tiroides, pulmón, próstata)²¹⁵, o la que hace referencia al subgrupo molecular CGB (centro germinal *B-Cell-Like*) o ABC (activado *B-Cell-Like*) post-CG activados²¹⁶.

Parámetros clínicos pronósticos tales como el IPI (Índice de Pronóstico Internacional) es utilizado en los LBCG como un modelo predictivo del curso clínico de los pacientes, aunque se ha visto que pacientes con el mismo IPI exhiben un pronóstico variable. La identificación de un grupo de pacientes de riesgo con mayor probabilidad de recaída podría ser beneficioso³⁴ para establecer un tratamiento protocolario que permita la remisión completa de la enfermedad. Sin embargo este modelo predictivo se encuentra condicionado por marcadores moleculares que van a afectar a la evolución de los LBCG²¹⁷.

Las diferencias entre las características clínicas y la respuesta al tratamiento dependerán de las características moleculares que modifican la enfermedad agresivamente²¹⁸. La heterogeneidad del curso clínico que presenta cada paciente puede ser el reflejo de las diferentes caracterizaciones biológicas de las células tumorales. Por lo que debemos buscar nuevos marcadores que ayuden a predecir el curso de estas enfermedades²¹⁹. En la literatura se ha referenciado que el desarrollo de los LBCG se ha asociado con algunas alteraciones moleculares concretas, aunque el papel que desarrollan como marcador pronóstico y significancia clínica es todavía controvertido a diferencia de otro tipo de linfomas^{220,129}. De aquí, la importancia de nuestro estudio que trata de esclarecer el papel que juega los reordenamientos de *BCL2*, *BCL6* y *MYC* en la evolución de los pacientes.

Las frecuencias que encontramos en cuanto a los 3 reordenamientos demostraron que su identificación puede ser de gran ayuda en el diagnóstico de los diferentes subgrupos de LBCG.

Se detectó el reordenamiento de *BCL2* entre los 64 casos de LBCG analizados en un porcentaje del 20.3%, De éste el 100% de los pacientes que debutaron en su forma primaria como LF tenían esta translocación, mientras que los que provenían de otro tipo de

LNH no tenían el reordenamiento de *BCL2*. Esto nos permite pensar que la presencia de *BCL2* se puede usar para determinar si el LBCG es transformado de LF²⁰⁴. Un 13.2% de muestras positivas para el reordenamiento de *BCL2* procedían de muestras diagnosticadas como *LBCG de Novo*, esto podría ser debido a que el tumor no fue detectado clínicamente en su forma primaria^{221, 222}. Otro dato a tener en cuenta es que de las muestras positivas, el 84.6% eran de origen ganglionar, siendo el reordenamiento de *BCL2* más típico de las formas ganglionares.

En cuanto al reordenamiento que afecta a la región 3q27, esta translocación fue encontrada en un 23.4% de las muestras respecto al 35% referenciado en la literatura^{97, 129, 223}, estando presente con mayor frecuencia en casos de origen extraganglionar que es como se suelen manifestar clínicamente^{223, 224}. En ningún caso se encontraron LF transformados a LBCG con el reordenamiento de *BCL6*. Los motivos pueden ser varios, el reordenamiento de *BCL6* se manifestó en nuestra serie como reordenamiento único, generalmente la mayoría de los casos transformados de LF a LBCG que presentan el reordenamiento de *BCL6* lo hacen paralelamente con el de *BCL2*, es decir, *BCL6* surgiría como alteración genética secundaria que ayudaría a la transformación del tumor, pero no se presentarían como reordenamiento único, forma más típica en los LF IIIb que como ya hemos mencionado, estas formas no presentan el mismo punto de rotura que en los LBCG¹², por lo que no representarían una progresión de los LF IIIb.

Otro dato a tener en cuenta es que 13 de los 15 casos que eran positivos para la alteración de *BCL6* se correspondía a *LBCG de Novo*, lo que refuerza la hipótesis de que este reordenamiento es más típico de los *LBCG de Novo*.

El reordenamiento de *MYC* fue encontrado en un 7,8% de todas las muestras analizadas en nuestro estudio siendo destacable que el 40% presentan un doble reordenamiento, siendo ésta la alteración que con mayor frecuencia se manifiesta con otros reordenamientos en LBCG²²⁵.

6.5.2. TRANSLOCACIONES Y EXPRESIÓN PROTEICA.

Nuestros datos muestran sobreexpresión de la proteína *BCL2* en el 83% de las muestras y reordenamiento sólo en un 20%, quedando patente que la translocación no es el

único mecanismo fisiopatológico que afecta a la expresión de BCL2. Iqbal et al ²²⁶ afirman que mecanismos alternativos tales como amplificación 18q21 parecen ser los principales responsables de la sobreexpresión de BCL2. En este caso los mecanismos alternativos por los que se produce la alteración de la expresión de BCL2 cobran mucho más protagonismo y son más frecuentes que la translocación.

De nuestra serie destacamos un caso que por inmunohistoquímica resultó negativo mientras que por FISH era positivo para el reordenamiento. La causa ya comentada de esta disparidad puede estar motivada por la existencia de mutaciones somáticas en BCL2 que originan cambios en la secuencia aminoácidica de la región del epitopo. Es decir que puede existir sobreexpresión de BCL2 pero no se pudo demostrar por técnicas IHQ y sí por técnicas citogenéticas. Esta disparidad refuerza la idea de que ambas técnicas deben ser complementarias.

En cuanto a la expresión de BCL6, al igual que para BCL2, obtuvimos reordenamiento en el 23% de las muestras, pero se detectó expresión de BCL6 en el 74% de las muestras analizadas, quedando patente que existen otros mecanismos ya mencionados, por los que se puede producir la alteración del gen BCL6.

La sobreexpresión de BCL6 es tan importante que un principio se consideró indispensable para la formación del desarrollo de los LBCG²²⁷, aunque estudios posteriores comprobarían que esta alteración por sí sola no era suficiente para la transformación de células malignas⁴².

6.5.3. IMPLICACIÓN DE LAS ALTERACIONES GENÉTICAS EN EL PRONÓSTICO Y LA SUPERVIVENCIA.

El papel del reordenamiento de *BCL2* como marcador de supervivencia en LBCG es polémico. Algunos estudios afirman que no es predictivo para la supervivencia^{129, 220, 228} mientras que otros dicen que es marcador de peor supervivencia²⁰⁴. Otra afirmación es que el valor predictivo de este reordenamiento es independiente de su expresión proteica²²⁹⁻²³¹, y asocian la sobreexpresión de BCL2 en pacientes diagnosticados con LBCG con un peor curso clínico¹²⁹.

Nuestros datos coinciden con los de Pulivarthi²³² y muestran diferencias significativas entre el reordenamiento de *BCL2* y una asociación a un estadio avanzado de la enfermedad, pero no encontramos diferencias significativas entre la presencia de la translocación y un curso más agresivo de la enfermedad y corta supervivencia¹²⁹. Otros autores sí han encontrado una asociación con peor supervivencia^{233,234, 235}, no para los LBCG en general, sino en un subgrupo de pacientes de peor pronóstico que presentaban translocación *BCL2* positiva y sobreexpresión de *BCL2* en los LBCG ganglionares. Es por tanto importante conocer la expresión proteica y dónde debuta por primera vez el tumor para tener en cuenta *BCL2* como marcador pronóstico²³⁶. Estos datos no dejan de ser contradictorios porque no explican por qué afectaría el reordenamiento de *BCL2* a un subtipo de LBCG y a otros no.

Por último, otra razón que nos lleva a pensar que el reordenamiento *BCL2* no tiene significación pronóstica por sí sola, se debe a que cuando la t(14;18)(q32;q21) está presente en células pequeñas de LF es generalmente síntoma de mejor pronóstico, mientras que cuando esto ocurre en LBCG es síntoma de peor pronóstico¹²⁹. Esto no tendría mucho sentido, más cuando estos linfomas derivan de LF.

Iqbal et al realizaron un análisis de sobreexpresión en el subgrupo de los LBCG ABC y encontraron un peor pronóstico aunque no una peor supervivencia. Nuestros resultados tampoco relacionaron la sobreexpresión de la proteína de *BCL2* con una peor supervivencia. Otros resultados sí que fueron capaces de demostrar que enfermos con sobreexpresión de *BCL2* presentaban un mayor riesgo de recidiva y una supervivencia más corta.²³⁷

En cuanto al reordenamiento de *BCL6* y su significado pronóstico existen datos contradictorios, aunque varias series independientes refieren la remisión de esta entidad con quimioterapia intensiva. Existen discrepancias entre los que afirman que no existen diferencias en el curso clínico^{97, 129, 220} de los pacientes con reordenamiento para *BCL6*, coincidiendo con nuestros datos, y los que dicen que la translocación implica una supervivencia y una supervivencia libre de enfermedad superior al resto²²³. Un grupo japonés refiere un plató de supervivencia libre de enfermedad en torno al 40% a partir de del tercer año para el LBCG con *BCL6* translocado²²⁴. Otros grupos afirman que representa un peor pronóstico^{110, 238}. A día de hoy no hay un consenso unánime acerca del papel del reordenamiento de *BCL6* y la supervivencia¹²⁹.

Nuestros datos confirman que el reordenamiento de *BCL6* no es predictivo para la supervivencia.⁹⁷ Si nos fijamos en las Tablas 21 y 22 se puede observar que para el reordenamiento de *BCL6* no existen diferencias significativas para la supervivencia, mientras que para la sobreexpresión de la proteína *BCL6* sí da un resultado significativo, pacientes con expresión alterada de esta proteína tendrán una mayor supervivencia global. Esta contradicción refuerza la idea de que la translocación por sí sola carece de valor predictivo.

Para utilizar *BCL6* como marcador de supervivencia debemos tener en cuenta todas las mutaciones moleculares que pueden participar en la expresión alterada de este oncogén de *BCL6*. A nivel molecular el reordenamiento de *BCL6* está presente en el 30-40% de los LBCG^{97, 223}, pero la mutación que implica al gen de *BCL6* está presente siempre en un porcentaje mayor de los casos (en torno al 70-80%). De nuestro estudio concluimos que para utilizar *BCL6* como marcador de supervivencia ha de tenerse en cuenta mediante el estudio inmunohistoquímico ya que el reordenamiento por sí sólo carece de valor²³⁹.

El estudio para el reordenamiento de *MYC* es todavía más complicado, ya que su presencia en los LBCG está representado en un porcentaje muy bajo (7-15%) en nuestro caso en torno al 7.8%. La cantidad de muestras positivas fueron demasiado bajas para intentar obtener una buena correlación estadística. Las 5 muestras que fueron positivas se correspondían con un estadio alto de la enfermedad, LDH elevado, MO infiltrada, extensión a localizaciones extraganglionares, aunque seguramente por el bajo número de resultados positivos no encontramos diferencias significativas. (Tabla 23)

En cuanto al reordenamiento de *MYC* y la supervivencia tampoco obtuvimos diferencias significativas^{107, 128, 129, 204} al igual que Ofiit, Kramer o Yunis. Al analizar solamente la gráfica (Tabla 24) parece apuntar diferencias, siendo el reordenamiento de *MYC* marcador de peor supervivencia que es lo que generalmente se afirma en la literatura^{110, 219, 240}, aunque para confirmar esta afirmación sería necesario un estudio de mayor número de muestras

Es muy común que *MYC* se presente con otros reordenamientos, tratándose de una alteración secundaria (en nuestros casos esto sucedía en el 40% de las muestras) y esto se asocia a un peor pronóstico²²⁵. Le Gouill²¹⁸ analizó 16 casos con doble reordenamiento de t(14;18)(q32;q21) y 8q24/C-*MYC* y lo asociaron con un subgrupo de peor pronóstico y un

curso clínico más agresivo, además identificaban 4 casos que tenían el doble reordenamiento y procedían de linfomas indolentes, ofreciendo la posibilidad de que el reordenamiento de MYC surja como un evento oncogénico adicional que ayuda a la transformación agresiva de los linfomas indolentes. El único caso que obtuvimos con el doble reordenamiento de t(14;18)(q32;q21) y 8q24/C-MYC también procedía de un LF transformado a LBCG, lo que apoya esta teoría. En ratones también se demostró que hiperplasias foliculares indolentes con sobreexpresión de BCL2 desencadenaban LBCG cuando adquirían el reordenamiento de MYC.²⁴¹

En general todas estas contradicciones descritas en la literatura se pueden justificar porque la mayoría de los estudios se llevan a cabo con series limitadas de pacientes y con un seguimiento escaso, por lo que es difícil extraer conclusiones. El tratamiento que recibe cada paciente también puede estar afectando a este tipo de estudios

Para una mejor comprensión de la biología de estas entidades se deben realizar estudios de expresión que precisen más los resultados de pérdidas o ganancias cromosómicas como pueden ser las técnicas de CGH e identificar otras alteraciones cromosómicas acompañantes iniciales con cierto significado pronóstico.

De nuestro estudio podemos concluir que las alteraciones genéticas estudiadas por sí solas no son un buen marcador predictivo del curso clínico de los LBCG. El curso clínico de cada paciente dependerá de una concatenación de eventos. Sin embargo sí que son buenos marcadores para diferenciar subtipos de LBCG.

Demostramos que el análisis en secciones finas de tejidos incluidos en parafina usando sondas split, constituye una buena herramienta para la determinación de las alteraciones estructurales de BCL2, BCL6 y MYC. Esta técnica también puede ser utilizada en ausencia de tejido fresco para la caracterización citogenética de poliploidías.

7. Conclusiones

1. La temperatura es un factor decisivo para obtener una buena señal de hibridación en la técnica de FISH. Altas o bajas temperaturas pueden enmascarar la señal de hibridación. Es más importante que se alcance la temperatura adecuada que el pretratamiento utilizado.
2. El control del tiempo de digestión mediante el método descrito (observación de “helechos”) mejora la reproducibilidad de la FISH en tejidos fijados e incluidos en parafina. Este método es particularmente útil cuando se trata de muestras con fijación heterogénea (casos consulta, autopsias,...), ya que evita repeticiones de la técnica y las consiguientes pérdidas de tiempo, material y reactivos.
3. Las sondas de “*split*” resultan de interpretación más fácil e intuitiva que las sondas “*dual fusion*”, y por tanto constituyen la opción preferente a la hora de integrar la técnica de FISH en la rutina diagnóstica de un laboratorio de Anatomía Patológica.
4. La técnica de FISH es superior a la técnica de PCR, tanto a nivel de rendimiento como de sensibilidad, en el estudio de la t(14;18)(q32;q21) y la t(11;14)(q13;q32).
5. Los LF de bajo y alto grado muestran diferente perfil molecular. En general los linfomas de bajo grado (I y II) se asocian con la t(14;18)(q32;q21), mientras que los de alto grado (IIIa y IIIb) lo hacen con el reordenamiento de *BCL6*.
6. En los LF y LBCG la t(14;18)(q32;q21) se asocia prácticamente en todos los casos a la sobreexpresión de la proteína BCL2 pero no ocurre igual a la inversa, ya que existen otros mecanismos alternativos que aumentan la expresión de BCL2.
7. En los LCM la t(11;14)(q13;q32) y la sobreexpresión de la CCND1 muestran una estrecha correlación. La inmunohistoquímica sería por tanto la primera opción para el diagnóstico de LCM, mientras que utilizaríamos la FISH en aquellos casos negativos o que persista la duda diagnóstica.
8. En los LBCG los reordenamientos de *BCL2* y *BCL6* parecen asociarse a características clínico-patológicas diferentes. El reordenamiento de *BCL2* se asocia más frecuentemente con la transformación previa de un LF y origen ganglionar, mientras que el reordenamiento de *BCL6* no se asocia con evidencia de LF previo.

9. En los LBCG el estudio de correlación entre los reordenamientos de *BCL2*, *BCL6* y *MYC*, y características clínicas, demostró asociación entre *BCL2* y estadio clínico avanzado, pero no entre dichas alteraciones moleculares y supervivencia global.
10. En los LBCG la sobreexpresión de *BCL6* predice una mayor supervivencia global.

8. Bibliografía

1. Forteza Vila J. Hematopathology: a leap forward in pathology. A personal view. *Semin Diagn Pathol*. 2008. 25(3): p. 166-77.
2. Wang M.; Johansen B.; Nissen M.H.; Thorn M.; Kloverpris H.; Fomsgaard A.; Buus S. & Claesson M.H. Identification of an HLA-A*0201 restricted Bcl2-derived epitope expressed on tumors. *Cancer Lett*. 2007. 251(1): p. 86-95.
3. Contran R.S.; Kumar V.C. & Collins T. Patología estructural y funcional. 2000, Madrid: McGraw-Hill-Interamericana de España.
4. Hodgkin T. On some morbid appearances of the absorbent glands *Med-Chir Trans*. 1832. 17: p. 69-97.
5. Harris N.L.; Stein H.; Coupland S.E.; Hummel M.; Favera R.D.; Pasqualucci L. & Chan W.C. New approaches to lymphoma diagnosis. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2001: p. 194-220.
6. Younes A.; Zhao S.; Jendiroba D.; Kleine H.D.; Cabanillas F. & Andreeff M. Decreased expression of the deleted in colorectal carcinoma gene in non-Hodgkin's lymphoma. *Blood*. 1995. 85(10): p. 2813-6.
7. Swerdlow S.H.; Campo E.; Harris N.L.; Jaffe E.S.; Pileri S.; Stein H.; Thiele J. & Vardiman J.W., eds. *Who Classification of tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. 2008, IARC Press: Lyon.
8. Anderson J.R.; Armitage J.O. & Weisenburger D.D. Epidemiology of the non-Hodgkin's lymphomas: distributions of the major subtypes differ by geographic locations. Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *Ann Oncol*. 1998. 9(7): p. 717-20.
9. Finn L.S.; Viswanatha D.S.; Belasco J.B.; Snyder H.; Huebner D.; Sorbara L.; Raffeld M.; Jaffe E.S. & Salhany K.E. Primary follicular lymphoma of the testis in childhood. *Cancer*. 1999. 85(7): p. 1626-35.
10. Ott G.; Katzenberger T.; Lohr A.; Kindelberger S.; Rudiger T.; Wilhelm M.; Kalla J.; Rosenwald A.; Muller J.G.; Ott M.M. & Muller-Hermelink H.K. Cytomorphologic, immunohistochemical, and cytogenetic profiles of follicular lymphoma: 2 types of follicular lymphoma grade 3. *Blood*. 2002. 99(10): p. 3806-12.
11. Katzenberger T.; Ott G.; Klein T.; Kalla J.; Muller-Hermelink H.K. & Ott M.M. Cytogenetic alterations affecting BCL6 are predominantly found in follicular lymphomas grade 3B with a diffuse large B-cell component. *Am J Pathol*. 2004. 165(2): p. 481-90.
12. Bosga-Bouwer A.G.; Haralambieva E.; Booman M.; Boonstra R.; van den Berg A.; Schuurin E.; van den Berg E.; Kluin P. & Poppema S. BCL6 alternative translocation breakpoint cluster region associated with follicular lymphoma grade 3B. *Genes Chromosomes Cancer*. 2005. 44(3): p. 301-4.
13. Bosga-Bouwer A.G.; van den Berg A.; Haralambieva E.; de Jong D.; Boonstra R.; Kluin P.; van den Berg E. & Poppema S. Molecular, cytogenetic, and immunophenotypic characterization of follicular lymphoma grade 3B; a separate entity or part of the spectrum of diffuse large B-cell lymphoma or follicular lymphoma? *Hum Pathol*. 2006. 37(5): p. 528-33.
14. Cattoretti G.; Chang C.C.; Cechova K.; Zhang J.; Ye B.H.; Falini B.; Louie D.C.; Offit K.; Chaganti R.S. & Dalla-Favera R. BCL-6 protein is expressed in germinal-center B cells. *Blood*. 1995. 86(1): p. 45-53.
15. Garcia J.F.; Piris M.A. & Morente M. Procesos linfoproliferativos no Hodgkin de células B. *Revista Española de Patología*. 2004. 37(2): p. 139-158.

16. Yunis J.J.; Frizzera G.; Oken M.M.; McKenna J.; Theologides A. & Arnesen M. Multiple recurrent genomic defects in follicular lymphoma. A possible model for cancer. *N Engl J Med.* 1987. 316(2): p. 79-84.
17. Horsman D.E.; Okamoto I.; Ludkovski O.; Le N.; Harder L.; Gesk S.; Siebert R.; Chhanabhai M.; Sehn L.; Connors J.M. & Gascoyne R.D. Follicular lymphoma lacking the t(14;18)(q32;q21): identification of two disease subtypes. *Br J Haematol.* 2003. 120(3): p. 424-33.
18. Diaz-Alderete A.; Doval A.; Camacho F.; Verde L.; Sabin P.; Arranz-Saez R.; Bellas C.; Corbacho C.; Gil J.; Perez-Martin M.; Ruiz-Marcellan M.; Gonzalez L.; Montalban C.; Piris M. & Menarguez J. Frequency of BCL2 and BCL6 translocations in follicular lymphoma: Relation with histological and clinical features. *Leuk Lymphoma.* 2008. 49(1): p. 95-101.
19. Raffeld M. & Jaffe E.S. bcl-1, t(11;14), and mantle cell-derived lymphomas. *Blood.* 1991. 78(2): p. 259-63.
20. Maravelaki S.; Burford A.; Wotherspoon A.; Joshi R.; Matutes E.; Catovsky D. & Brito-Babapulle V. Molecular cytogenetic study of a mantle cell lymphoma with a complex translocation involving the CCND1 (11q13) region. *Cancer Genet Cytogenet.* 2004. 154(1): p. 67-71.
21. Argatoff L.H.; Connors J.M.; Klasa R.J.; Horsman D.E. & Gascoyne R.D. Mantle cell lymphoma: a clinicopathologic study of 80 cases. *Blood.* 1997. 89(6): p. 2067-78.
22. Campo E.; Raffeld M. & Jaffe E.S. Mantle-cell lymphoma. *Semin Hematol.* 1999. 36(2): p. 115-27.
23. Swerdlow S.H.; Habeshaw J.A.; Murray L.J.; Dhaliwal H.S.; Lister T.A. & Stansfeld A.G. Centrocytic lymphoma: a distinct clinicopathologic and immunologic entity. A multiparameter study of 18 cases at diagnosis and relapse. *Am J Pathol.* 1983. 113(2): p. 181-97.
24. Lennert K. Introduction--functional and morphological aspects of malignant lymphomas. *Adv Exp Med Biol.* 1979. 114: p. 541-3.
25. Bookman M.A.; Lardelli P.; Jaffe E.S.; Duffey P.L. & Longo D.L. Lymphocytic lymphoma of intermediate differentiation: morphologic, immunophenotypic, and prognostic factors. *J Natl Cancer Inst.* 1990. 82(9): p. 742-8.
26. Monteil M.; Callanan M.; Dascalescu C.; Sotto J.J. & Leroux D. Molecular diagnosis of t(11;14) in mantle cell lymphoma using two-colour interphase fluorescence in situ hybridization. *Br J Haematol.* 1996. 93(3): p. 656-60.
27. Rosenberg C.L.; Wong E.; Petty E.M.; Bale A.E.; Tsujimoto Y.; Harris N.L. & Arnold A. PRAD1, a candidate BCL1 oncogene: mapping and expression in centrocytic lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991. 88(21): p. 9638-42.
28. Vaandrager J.W.; Schuurin E.; Zwikstra E.; de Boer C.J.; Kleiverda K.K.; van Krieken J.H.; Kluin-Nelemans H.C.; van Ommen G.J.; Raap A.K. & Kluin P.M. Direct visualization of dispersed 11q13 chromosomal translocations in mantle cell lymphoma by multicolor DNA fiber fluorescence in situ hybridization. *Blood.* 1996. 88(4): p. 1177-82.
29. de Boer C.J.; van Krieken J.H.; Schuurin E. & Kluin P.M. Bcl-1/cyclin D1 in malignant lymphoma. *Ann Oncol.* 1997. 8 Suppl 2: p. 109-17.
30. Kodet R.; Mrhalova M.; Krskova L.; Soukup J.; Campr V.; Neskudla T.; Szepe P. & Plank L. Mantle cell lymphoma: improved diagnostics using a combined approach of immunohistochemistry and identification of t(11;14)(q13;q32) by

- polymerase chain reaction and fluorescence in situ hybridization. *Virchows Arch.* 2003. 442(6): p. 538-47.
31. Sun T.; Nordberg M.L.; Cotelingam J.D.; Veillon D.M. & Ryder J. Fluorescence in situ hybridization: method of choice for a definitive diagnosis of mantle cell lymphoma. *Am J Hematol.* 2003. 74(1): p. 78-84.
 32. Caraway N.P.; Gu J.; Lin P.; Romaguera J.E.; Glassman A. & Katz R. The utility of interphase fluorescence in situ hybridization for the detection of the translocation t(11;14)(q13;q32) in the diagnosis of mantle cell lymphoma on fine-needle aspiration specimens. *Cancer.* 2005. 105(2): p. 110-8.
 33. Rammeh-Rommani S.; Zermani R.; Sfaxi M.; Chabchoub A.; Zouari B.; Ayed M. & Ben Jilani-Baltagi S. [Prognostic value of the immunohistochemical expression of: Ki67, p53, PCNA and Bcl2 in the superficial tumors of the bladder]. *Tunis Med.* 2007. 85(6): p. 509-12.
 34. Hirose Y.; Masaki Y.; Karasawa H.; Shimoyama K.; Fukushima T.; Kawabata H.; Ogawa N.; Wano Y. & Ozaki M. Incidence of diffuse large B-cell lymphoma of germinal center B-cell origin in whole diffuse large B-cell lymphoma: tissue fluorescence in situ hybridization using t(14;18) compared with immunohistochemistry. *Int J Hematol.* 2005. 81(1): p. 48-57.
 35. Zhang X.; Karnan S.; Tagawa H.; Suzuki R.; Tsuzuki S.; Hosokawa Y.; Morishima Y.; Nakamura S. & Seto M. Comparison of genetic aberrations in CD10+ diffused large B-cell lymphoma and follicular lymphoma by comparative genomic hybridization and tissue-fluorescence in situ hybridization. *Cancer Sci.* 2004. 95(10): p. 809-14.
 36. Niu H. The proto-oncogene BCL-6 in normal and malignant B cell development. *Hematol Oncol.* 2002. 20(4): p. 155-66.
 37. Haralambieva E.; Banham A.H.; Bastard C.; Delsol G.; Gaulard P.; Ott G.; Pileri S.; Fletcher J.A. & Mason D.Y. Detection by the fluorescence in situ hybridization technique of MYC translocations in paraffin-embedded lymphoma biopsy samples. *Br J Haematol.* 2003. 121(1): p. 49-56.
 38. Regueiro. R & López. R, eds. *Inmunología Biología y Patología del Sistema Inmune.* 1997, Medicina Panamérica: Madrid.
 39. Fenton J.A.; Vaandrager J.W.; Aarts W.M.; Bende R.J.; Heering K.; van Dijk M.; Morgan G.; van Noesel C.J.; Schuurin E. & Kluin P.M. Follicular lymphoma with a novel t(14;18) breakpoint involving the immunoglobulin heavy chain switch mu region indicates an origin from germinal center B cells. *Blood.* 2002. 99(2): p. 716-8.
 40. Tsujimoto Y.; Ikegaki N. & Croce C.M. Characterization of the protein product of bcl-2, the gene involved in human follicular lymphoma. *Oncogene.* 1987. 2(1): p. 3-7.
 41. Zutter M.; Hockenbery D.; Silverman G.A. & Korsmeyer S.J. Immunolocalization of the Bcl-2 protein within hematopoietic neoplasms. *Blood.* 1991. 78(4): p. 1062-8.
 42. Yang X.; Lee K.; Said J.; Gong X. & Zhang K. Association of Ig/BCL6 translocations with germinal center B lymphocytes in human lymphoid tissues: implications for malignant transformation. *Blood.* 2006. 108(6): p. 2006-12.
 43. Graninger W.B.; Seto M.; Boutain B.; Goldman P. & Korsmeyer S.J. Expression of Bcl-2 and Bcl-2-Ig fusion transcripts in normal and neoplastic cells. *J Clin Invest.* 1987. 80(5): p. 1512-5.

44. Schraders M.; de Jong D.; Kluin P.; Groenen P. & van Krieken H. Lack of Bcl-2 expression in follicular lymphoma may be caused by mutations in the BCL2 gene or by absence of the t(14;18) translocation. *J Pathol.* 2005. 205(3): p. 329-35.
45. Hsi E.D.; Mirza I.; Lozanski G.; Hill J.; Pohlman B.; Karafa M.T. & Coupland R. A clinicopathologic evaluation of follicular lymphoma grade 3A versus grade 3B reveals no survival differences. *Arch Pathol Lab Med.* 2004. 128(8): p. 863-8.
46. Stetler-Stevenson M.; Crush-Stanton S. & Cossman J. Involvement of the bcl-2 gene in Hodgkin's disease. *J Natl Cancer Inst.* 1990. 82(10): p. 855-8.
47. Siebert R.; Matthiesen P.; Harder S.; Zhang Y.; Borowski A.; Zuhlke-Jenisch R.; Metzke S.; Joos S.; Weber-Matthiesen K.; Grote W. & Schlegelberger B. Application of interphase fluorescence in situ Hybridization for the detection of the Burkitt translocation t(8;14)(q24;q32) in B-cell lymphomas. *Blood.* 1998. 91(3): p. 984-90.
48. Siebert R. & Weber-Matthiesen K. Fluorescence in situ hybridization as a diagnostic tool in malignant lymphomas. *Histochem Cell Biol.* 1997. 108(4-5): p. 391-402.
49. Limpens J.; de Jong D.; van Krieken J.H.; Price C.G.; Young B.D.; van Ommen G.J. & Kluin P.M. Bcl-2/JH rearrangements in benign lymphoid tissues with follicular hyperplasia. *Oncogene.* 1991. 6(12): p. 2271-6.
50. Tsujimoto Y.; Cossman J.; Jaffe E. & Croce C.M. Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science.* 1985. 228(4706): p. 1440-3.
51. Buchonnet G.; Jardin F.; Jean N.; Bertrand P.; Parmentier F.; Tison S.; Lepretre S.; Contentin N.; Lenain P.; Stamatoullas-Bastard A.; Tilly H. & Bastard C. Distribution of BCL2 breakpoints in follicular lymphoma and correlation with clinical features: specific subtypes or same disease? *Leukemia.* 2002. 16(9): p. 1852-6.
52. Buchonnet G.; Lenain P.; Ruminy P.; Lepretre S.; Stamatoullas A.; Parmentier F.; Jardin F.; Duval C.; Tilly H. & Bastard C. Characterisation of BCL2-JH rearrangements in follicular lymphoma: PCR detection of 3' BCL2 breakpoints and evidence of a new cluster. *Leukemia.* 2000. 14(9): p. 1563-9.
53. Willis T.G.; Jadayel D.M.; Coignet L.J.; Abdul-Rauf M.; Treleaven J.G.; Catovsky D. & Dyer M.J. Rapid molecular cloning of rearrangements of the IGHJ locus using long-distance inverse polymerase chain reaction. *Blood.* 1997. 90(6): p. 2456-64.
54. Albinger-Hegyí A.; Hochreutener B.; Abdou M.T.; Hegyi I.; Dours-Zimmermann M.T.; Kurrer M.O.; Heitz P.U. & Zimmermann D.R. High frequency of t(14;18)-translocation breakpoints outside of major breakpoint and minor cluster regions in follicular lymphomas: improved polymerase chain reaction protocols for their detection. *Am J Pathol.* 2002. 160(3): p. 823-32.
55. Clery ML G., Sklar J. Detection of the second t(14;18) brekpoint cluster region in follicular Lymphomas. *J Exp Med* 1886. 164:: p. 315-320.
56. Tsujimoto Y.; Bashir M.M.; Givol I.; Cossman J.; Jaffe E. & Croce C.M. DNA rearrangements in human follicular lymphoma can involve the 5' or the 3' region of the bcl-2 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987. 84(5): p. 1329-31.
57. Weinberg O.K.; Ai W.Z.; Mariappan M.R.; Shum C.; Levy R. & Arber D.A. "Minor" BCL2 breakpoints in follicular lymphoma: frequency and correlation with grade and disease presentation in 236 cases. *J Mol Diagn.* 2007. 9(4): p. 530-7.
58. Gomez M.; Wu X. & Wang Y.L. Detection of BCL2-IGH using single-round PCR assays. *Diagn Mol Pathol.* 2005. 14(1): p. 17-22.

59. Adachi M.; Cossman J.; Longo D.; Croce C.M. & Tsujimoto Y. Variant translocation of the bcl-2 gene to immunoglobulin lambda light chain gene in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989. 86(8): p. 2771-4.
60. Vaandrager J.W.; Schuurin E.; Philippo K. & Kluin P.M. V(D)J recombinase-mediated transposition of the BCL2 gene to the IGH locus in follicular lymphoma. *Blood*. 2000. 96(5): p. 1947-52.
61. Einerson R.R.; Kurtin P.J.; Dayharsh G.A.; Kimlinger T.K. & Remstein E.D. FISH is superior to PCR in detecting t(14;18)(q32;q21)-IgH/bcl-2 in follicular lymphoma using paraffin-embedded tissue samples. *Am J Clin Pathol*. 2005. 124(3): p. 421-9.
62. Godon A.; Moreau A.; Talmant P.; Baranger-Papot L.; Genevieve F.; Milpied N.; Zandecki M. & Avet-Loiseau H. Is t(14;18)(q32;q21) a constant finding in follicular lymphoma? An interphase FISH study on 63 patients. *Leukemia*. 2003. 17(1): p. 255-9.
63. Ueda Y.; Matsuda F.; Misawa S. & Taniwaki M. Tumor-specific rearrangements of the immunoglobulin heavy-chain gene in B-cell non-Hodgkin's lymphoma detected by in situ hybridization. *Blood*. 1996. 87(1): p. 292-8.
64. Peh S.C.; Shaminie J.; Tai Y.C.; Tan J. & Gan S.S. The pattern and frequency of t(14;18) translocation and immunophenotype in Asian follicular lymphoma. *Histopathology*. 2004. 45(5): p. 501-10.
65. Jaeger U.; Purtscher B.; Karth G.D.; Knapp S.; Mannhalter C. & Lechner K. Mechanism of the chromosomal translocation t(14;18) in lymphoma: detection of a 45-Kd breakpoint binding protein. *Blood*. 1993. 81(7): p. 1833-40.
66. Willis T.G. & Dyer M.J. The role of immunoglobulin translocations in the pathogenesis of B-cell malignancies. *Blood*. 2000. 96(3): p. 808-22.
67. Okano A.; Nakano S.; Namura K.; Yamada N.; Uchida R.; Fuchida S.; Okamoto M.; Ochiai N. & Shimazaki C. Unique three-way translocation, t(3;14;18)(q27;q32;q21), in follicular lymphoma. *Cancer Genet Cytogenet*. 2005. 159(2): p. 174-6.
68. Rosenwald A.; Ott G.; Katzenberger T.; Siebert R.; Kalla J.; Kuse R.; Ott M.M.; Muller-Hermelink H.K. & Schlegelberger B. Jumping translocation of 1q as the sole aberration in a case of follicular lymphoma. *Cancer Genet Cytogenet*. 1999. 108(1): p. 53-6.
69. Fu K.; Weisenburger D.D.; Greiner T.C.; Dave S.; Wright G.; Rosenwald A.; Chiorazzi M.; Iqbal J.; Gesk S.; Siebert R.; De Jong D.; Jaffe E.S.; Wilson W.H.; Delabie J.; Ott G.; Dave B.J.; Sanger W.G.; Smith L.M.; Rimsza L.; Braziel R.M.; Muller-Hermelink H.K.; Campo E.; Gascoyne R.D.; Staudt L.M. & Chan W.C. Cyclin D1-negative mantle cell lymphoma: a clinicopathologic study based on gene expression profiling. *Blood*. 2005. 106(13): p. 4315-21.
70. Frater J.L.; Tsiftsakakis E.K.; Hsi E.D.; Pettay J. & Tubbs R.R. Use of novel t(11;14) and t(14;18) dual-fusion fluorescence in situ hybridization probes in the differential diagnosis of lymphomas of small lymphocytes. *Diagn Mol Pathol*. 2001. 10(4): p. 214-22.
71. Orchard J.; Garand R.; Davis Z.; Babbage G.; Sahota S.; Matutes E.; Catovsky D.; Thomas P.W.; Avet-Loiseau H. & Oscier D. A subset of t(11;14) lymphoma with mantle cell features displays mutated IgVH genes and includes patients with good prognosis, nonnodal disease. *Blood*. 2003. 101(12): p. 4975-81.
72. Walsh S.H.; Thorselius M.; Johnson A.; Soderberg O.; Jerkeman M.; Bjorck E.; Eriksson I.; Thunberg U.; Landgren O.; Ehinger M.; Lofvenberg E.; Wallman K.; Enblad G.; Sander B.; Porwit-MacDonald A.; Dictor M.; Olofsson T.; Sundstrom

- C.; Roos G. & Rosenquist R. Mutated VH genes and preferential VH3-21 use define new subsets of mantle cell lymphoma. *Blood*. 2003. 101(10): p. 4047-54.
73. Stamatopoulos K.; Kosmas C.; Belessi C.; Kyriazopoulos P.; Papadaki T.; Anagnostou D. & Loukopoulos D. Molecular analysis of bcl-1/IgH junctional sequences in mantle cell lymphoma: potential mechanism of the t(11;14) chromosomal translocation. *Br J Haematol*. 1999. 105(1): p. 190-7.
74. Motokura T. & Arnold A. Cyclins and oncogenesis. *Biochim Biophys Acta*. 1993. 1155(1): p. 63-78.
75. Coignet L.J.; Schuurin E.; Kibbelaar R.E.; Raap T.K.; Kleiverda K.K.; Bertheas M.F.; Wiegant J.; Beverstock G. & Kluin P.M. Detection of 11q13 rearrangements in hematologic neoplasias by double-color fluorescence in situ hybridization. *Blood*. 1996. 87(4): p. 1512-9.
76. Rimokh R.; Berger F.; Delsol G.; Digonnet I.; Rouault J.P.; Tigaud J.D.; Gadoux M.; Coiffier B.; Bryon P.A. & Magaud J.P. Detection of the chromosomal translocation t(11;14) by polymerase chain reaction in mantle cell lymphomas. *Blood*. 1994. 83(7): p. 1871-5.
77. Raynaud S.D.; Bekri S.; Leroux D.; Grosgeorge J.; Klein B.; Bastard C.; Gaudray P. & Simon M.P. Expanded range of 11q13 breakpoints with differing patterns of cyclin D1 expression in B-cell malignancies. *Genes Chromosomes Cancer*. 1993. 8(2): p. 80-7.
78. Rimokh R.; Berger F.; Delsol G.; Charrin C.; Bertheas M.F.; Ffrench M.; Garoscio M.; Felman P.; Coiffier B.; Bryon P.A. & et al. Rearrangement and overexpression of the BCL-1/PRAD-1 gene in intermediate lymphocytic lymphomas and in t(11q13)-bearing leukemias. *Blood*. 1993. 81(11): p. 3063-7.
79. Fan Y.S.; Rizkalla K.; William B.F. & Engel C.J. Jumping translocations of 11q in acute myeloid leukemia and 1q in follicular lymphoma. *Cancer Genet Cytogenet*. 2000. 118(1): p. 35-41.
80. Rimokh R.; Berger F.; Bastard C.; Klein B.; French M.; Archimbaud E.; Rouault J.P.; Santa Lucia B.; Duret L.; Vuillaume M. & et al. Rearrangement of CCND1 (BCL1/PRAD1) 3' untranslated region in mantle-cell lymphomas and t(11q13)-associated leukemias. *Blood*. 1994. 83(12): p. 3689-96.
81. Fernandez V.; Hartmann E.; Ott G.; Campo E. & Rosenwald A. Pathogenesis of mantle-cell lymphoma: all oncogenic roads lead to dysregulation of cell cycle and DNA damage response pathways. *J Clin Oncol*. 2005. 23(26): p. 6364-9.
82. Jares P. & Campo E. Advances in the understanding of mantle cell lymphoma. *Br J Haematol*. 2008.
83. Bodrug S.E.; Warner B.J.; Bath M.L.; Lindeman G.J.; Harris A.W. & Adams J.M. Cyclin D1 transgene impedes lymphocyte maturation and collaborates in lymphomagenesis with the myc gene. *EMBO J*. 1994. 13(9): p. 2124-30.
84. Potter K.N.; Orchard J.; Critchley E.; Mockridge C.I.; Jose A. & Stevenson F.K. Features of the overexpressed V1-69 genes in the unmutated subset of chronic lymphocytic leukemia are distinct from those in the healthy elderly repertoire. *Blood*. 2003. 101(8): p. 3082-4.
85. Lovec H.; Grzeschiczek A.; Kowalski M.B. & Moroy T. Cyclin D1/bcl-1 cooperates with myc genes in the generation of B-cell lymphoma in transgenic mice. *EMBO J*. 1994. 13(15): p. 3487-95.
86. Albagli-Curiel O. Ambivalent role of BCL6 in cell survival and transformation. *Oncogene*. 2003. 22(4): p. 507-16.

87. Dhordain P.; Albagli O.; Ansieau S.; Koken M.H.; Deweindt C.; Quief S.; Lantoine D.; Leutz A.; Kerckaert J.P. & Leprince D. The BTB/POZ domain targets the LAZ3/BCL6 oncoprotein to nuclear dots and mediates homomerisation in vivo. *Oncogene*. 1995. 11(12): p. 2689-97.
88. Lemerrier C.; Brocard M.P.; Puvion-Dutilleul F.; Kao H.Y.; Albagli O. & Khochbin S. Class II histone deacetylases are directly recruited by BCL6 transcriptional repressor. *J Biol Chem*. 2002. 277(24): p. 22045-52.
89. Hou J.W. & Wang T.R. Chromosomal rearrangements detected by FISH and G-banding. *J Formos Med Assoc*. 1996. 95(9): p. 686-91.
90. Dent A.L.; Shaffer A.L.; Yu X.; Allman D. & Staudt L.M. Control of inflammation, cytokine expression, and germinal center formation by BCL-6. *Science*. 1997. 276(5312): p. 589-92.
91. Fukuda T.; Yoshida T.; Okada S.; Hatano M.; Miki T.; Ishibashi K.; Okabe S.; Koseki H.; Hirose S.; Taniguchi M.; Miyasaka N. & Tokuhisa T. Disruption of the Bcl6 gene results in an impaired germinal center formation. *J Exp Med*. 1997. 186(3): p. 439-48.
92. Ohno H. Pathogenetic role of BCL6 translocation in B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Histol Histopathol*. 2004. 19(2): p. 637-50.
93. Colomo L.; Lopez-Guillermo A.; Perales M.; Rives S.; Martinez A.; Bosch F.; Colomer D.; Falini B.; Montserrat E. & Campo E. Clinical impact of the differentiation profile assessed by immunophenotyping in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 2003. 101(1): p. 78-84.
94. Chaganti S.R.; Rao P.H.; Chen W.; Dyomin V.; Jhanwar S.C.; Parsa N.Z.; Dalla-Favera R. & Chaganti R.S. Deregulation of BCL6 in non-Hodgkin lymphoma by insertion of IGH sequences in complex translocations involving band 3q27. *Genes Chromosomes Cancer*. 1998. 23(4): p. 328-36.
95. Ohno H. & Fukuhara S. Significance of rearrangement of the BCL6 gene in B-cell lymphoid neoplasms. *Leuk Lymphoma*. 1997. 27(1-2): p. 53-63.
96. Ueda Y.; Nishida K.; Miki T.; Horiike S.; Kaneko H.; Yokota S.; Misawa S.; Abe T.; Kashima K. & Taniwaki M. Interphase detection of BCL6/IgH fusion gene in non-Hodgkin lymphoma by fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genet Cytogenet*. 1997. 99(2): p. 102-7.
97. Bastard C.; Tilly H.; Lenormand B.; Bigorgne C.; Boulet D.; Kunlin A.; Monconduit M. & Piguet H. Translocations involving band 3q27 and Ig gene regions in non-Hodgkin's lymphoma. *Blood*. 1992. 79(10): p. 2527-31.
98. Yonetani N.; Akasaka T.; Akasaka H.; Ohno H.; Okuma M.; Miura I.; Takahashi N.; Miyanishi S.; Okumura A.; Muramatsu M. & Fukuhara S. Molecular features of a new human lymphoma cell line carrying both BCL2 and BCL6 gene rearrangements. *Oncogene*. 1998. 17(8): p. 971-9.
99. Ye B.H.; Lista F.; Lo Coco F.; Knowles D.M.; Offit K.; Chaganti R.S. & Dalla-Favera R. Alterations of a zinc finger-encoding gene, BCL-6, in diffuse large-cell lymphoma. *Science*. 1993. 262(5134): p. 747-50.
100. Iqbal J.; Greiner T.C.; Patel K.; Dave B.J.; Smith L.; Ji J.; Wright G.; Sanger W.G.; Pickering D.L.; Jain S.; Horsman D.E.; Shen Y.; Fu K.; Weisenburger D.D.; Hans C.P.; Campo E.; Gascoyne R.D.; Rosenwald A.; Jaffe E.S.; Delabie J.; Rimsza L.; Ott G.; Muller-Hermelink H.K.; Connors J.M.; Vose J.M.; McKeithan T.; Staudt L.M. & Chan W.C. Distinctive patterns of BCL6 molecular alterations and their functional consequences in different subgroups of diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia*. 2007. 21(11): p. 2332-43.

101. Chen W.; Butler M.; Rao P.H.; Chaganti S.R.; Louie D.C.; Dalla-Favera R. & Chaganti R.S. The t(2;3)(q21;q27) translocation in non-Hodgkin's lymphoma displays BCL6 mutations in the 5' regulatory region and chromosomal breakpoints distant from the gene. *Oncogene*. 1998. 17(13): p. 1717-22.
102. Butler M.P.; Iida S.; Capello D.; Rossi D.; Rao P.H.; Nallasivam P.; Louie D.C.; Chaganti S.; Au T.; Gascoyne R.D.; Gaidano G.; Chaganti R.S. & Dalla-Favera R. Alternative translocation breakpoint cluster region 5' to BCL-6 in B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer Res*. 2002. 62(14): p. 4089-94.
103. Keller C.E.; Nandula S.; Fisher J.; Subramaniam S.; Vakiani E.; Savage D.G.; Murty V.V.; Alobeid B. & Bhagat G. The spectrum of B-cell non-Hodgkin lymphomas with dual IgH-BCL2 and BCL6 translocations. *Am J Clin Pathol*. 2008. 130(2): p. 193-201.
104. Shaffer A.L.; Lin K.I.; Kuo T.C.; Yu X.; Hurt E.M.; Rosenwald A.; Giltnane J.M.; Yang L.; Zhao H.; Calame K. & Staudt L.M. Blimp-1 orchestrates plasma cell differentiation by extinguishing the mature B cell gene expression program. *Immunity*. 2002. 17(1): p. 51-62.
105. Hann S.R.; King M.W.; Bentley D.L.; Anderson C.W. & Eisenman R.N. A non-AUG translational initiation in c-myc exon 1 generates an N-terminally distinct protein whose synthesis is disrupted in Burkitt's lymphomas. *Cell*. 1988. 52(2): p. 185-95.
106. Yano T.; Jaffe E.S.; Longo D.L. & Raffeld M. MYC rearrangements in histologically progressed follicular lymphomas. *Blood*. 1992. 80(3): p. 758-67.
107. Ladanyi M.; Offit K.; Jhanwar S.C.; Filippa D.A. & Chaganti R.S. MYC rearrangement and translocations involving band 8q24 in diffuse large cell lymphomas. *Blood*. 1991. 77(5): p. 1057-63.
108. Haluska F.G.; Tsujimoto Y. & Croce C.M. Oncogene activation by chromosome translocation in human malignancy. *Annu Rev Genet*. 1987. 21: p. 321-45.
109. Wiman K.G.; Clarkson B.; Hayday A.C.; Saito H.; Tonegawa S. & Hayward W.S. Activation of a translocated c-myc gene: role of structural alterations in the upstream region. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1984. 81(21): p. 6798-802.
110. Akasaka T.; Akasaka H.; Ueda C.; Yonetani N.; Maesako Y.; Shimizu A.; Yamabe H.; Fukuhara S.; Uchiyama T. & Ohno H. Molecular and clinical features of non-Burkitt's, diffuse large-cell lymphoma of B-cell type associated with the c-MYC/immunoglobulin heavy-chain fusion gene. *J Clin Oncol*. 2000. 18(3): p. 510-18.
111. Madisen L. & Groudine M. Identification of a locus control region in the immunoglobulin heavy-chain locus that deregulates c-myc expression in plasmacytoma and Burkitt's lymphoma cells. *Genes Dev*. 1994. 8(18): p. 2212-26.
112. Kanungo A.; Medeiros L.J.; Abruzzo L.V. & Lin P. Lymphoid neoplasms associated with concurrent t(14;18) and 8q24/c-MYC translocation generally have a poor prognosis. *Mod Pathol*. 2006. 19(1): p. 25-33.
113. Elenitoba-Johnson K.S.; Bohling S.D.; Mitchell R.S.; Brown M.S. & Robetorye R.S. PCR analysis of the immunoglobulin heavy chain gene in polyclonal processes can yield pseudoclonal bands as an artifact of low B cell number. *J Mol Diagn*. 2000. 2(2): p. 92-6.
114. Lombardo J.F.; Hwang T.S.; Maiese R.L.; Millson A. & Segal G.H. Optimal primer selection for clonality assessment by polymerase chain reaction analysis. III. Intermediate and high-grade B-cell neoplasms. *Hum Pathol*. 1996. 27(4): p. 373-80.

115. van Dongen J.J.; Langerak A.W.; Bruggemann M.; Evans P.A.; Hummel M.; Lavender F.L.; Delabesse E.; Davi F.; Schuurin E.; Garcia-Sanz R.; van Krieken J.H.; Droese J.; Gonzalez D.; Bastard C.; White H.E.; Spaargaren M.; Gonzalez M.; Parreira A.; Smith J.L.; Morgan G.J.; Kneba M. & Macintyre E.A. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia*. 2003. 17(12): p. 2257-317.
116. Espinet B.; Bellosillo B.; Melero C.; Vela M.C.; Pedro C.; Salido M.; Pijuan L.; Florensa L.; Besses C.; Serrano S. & Sole F. FISH is better than BIOMED-2 PCR to detect IgH/BCL2 translocation in follicular lymphoma at diagnosis using paraffin-embedded tissue sections. *Leuk Res*. 2007.
117. Raimundo-Moral. R ed. *Labarotario de Anatomía Patológica*. 1991, Interamerica Mc Graw-Hill: Madrid.
118. Feldman M.Y. Reactions of nucleic acids and nucleoproteins with formaldehyde. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 1973. 13: p. 1-49.
119. Young B & Heath J W., eds. *Wheater's Functional History*. 4 ed. 2000, Churchill Livingstone: London.
120. Biegel J.A.; Nycum L.M.; Valentine V.; Barr F.G. & Shapiro D.N. Detection of the t(2;13)(q35;q14) and PAX3-FKHR fusion in alveolar rhabdomyosarcoma by fluorescence in situ hybridization. *Genes Chromosomes Cancer*. 1995. 12(3): p. 186-92.
121. Pardue M.L. & Gall J.G. Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1969. 64(2): p. 600-4.
122. Reis-Filho J.S. & de Lander Schmitt F.C. Fluorescence in situ hybridization, comparative genomic hybridization, and other molecular biology techniques in the analysis of effusions. *Diagn Cytopathol*. 2005. 33(5): p. 294-9.
123. Chin S.F.; Daigo Y.; Huang H.E.; Iyer N.G.; Callagy G.; Kranjac T.; Gonzalez M.; Sangan T.; Earl H. & Caldas C. A simple and reliable pretreatment protocol facilitates fluorescent in situ hybridisation on tissue microarrays of paraffin wax embedded tumour samples. *Mol Pathol*. 2003. 56(5): p. 275-9.
124. Aubele M.; Zitzelsberger H.; Szucs S.; Werner M.; Braselmann H.; Hutzler P.; Rodenacker K.; Lehmann L.; Minkus G. & Hofler H. Comparative FISH analysis of numerical chromosome 7 abnormalities in 5-micron and 15-micron paraffin-embedded tissue sections from prostatic carcinoma. *Histochem Cell Biol*. 1997. 107(2): p. 121-6.
125. Thompson C.T.; LeBoit P.E.; Nederlof P.M. & Gray J.W. Thick-section fluorescence in situ hybridization on formalin-fixed, paraffin-embedded archival tissue provides a histogenetic profile. *Am J Pathol*. 1994. 144(2): p. 237-43.
126. Petersen B.L.; Sorensen M.C.; Pedersen S. & Rasmussen M. Fluorescence in situ hybridization on formalin-fixed and paraffin-embedded tissue: optimizing the method. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2004. 12(3): p. 259-65.
127. Cook J.R. Paraffin section interphase fluorescence in situ hybridization in the diagnosis and classification of non-hodgkin lymphomas. *Diagn Mol Pathol*. 2004. 13(4): p. 197-206.
128. Offit K.; Jhanwar S.C.; Ladanyi M.; Filippa D.A. & Chaganti R.S. Cytogenetic analysis of 434 consecutively ascertained specimens of non-Hodgkin's lymphoma: correlations between recurrent aberrations, histology, and exposure to cytotoxic treatment. *Genes Chromosomes Cancer*. 1991. 3(3): p. 189-201.

129. Kramer M.H.; Hermans J.; Wijburg E.; Philipppo K.; Geelen E.; van Krieken J.H.; de Jong D.; Maartense E.; Schuurin E. & Kluin P.M. Clinical relevance of BCL2, BCL6, and MYC rearrangements in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 1998. 92(9): p. 3152-62.
130. Lopez-Guillermo A.; Cabanillas F.; McDonnell T.I.; McLaughlin P.; Smith T.; Pugh W.; Hagemester F.; Rodriguez M.A.; Romaguera J.E.; Younes A.; Sarris A.H.; Preti H.A. & Lee M.S. Correlation of bcl-2 rearrangement with clinical characteristics and outcome in indolent follicular lymphoma. *Blood*. 1999. 93(9): p. 3081-7.
131. Ventura R.A.; Martin-Subero J.I.; Jones M.; McParland J.; Gesk S.; Mason D.Y. & Siebert R. FISH analysis for the detection of lymphoma-associated chromosomal abnormalities in routine paraffin-embedded tissue. *J Mol Diagn*. 2006. 8(2): p. 141-51.
132. Segal G.H.; Jorgensen T.; Scott M. & Braylan R.C. Optimal primer selection for clonality assessment by polymerase chain reaction analysis: II. Follicular lymphomas. *Hum Pathol*. 1994. 25(12): p. 1276-82.
133. Williams M.E.; Swerdlow S.H. & Meeker T.C. Chromosome t(11;14)(q13;q32) breakpoints in centrocytic lymphoma are highly localized at the bcl-1 major translocation cluster. *Leukemia*. 1993. 7(9): p. 1437-40.
134. Kodama T.; Ohshima K.; Nomura K.; Taniwaki M.; Nakamura N.; Nakamura S.; Kohno S.; Yamamoto J.; Karube K.; Yamasita Y.; Shirakusa T. & Kikuchi M. Lymphomatous polyposis of the gastrointestinal tract, including mantle cell lymphoma, follicular lymphoma and mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Histopathology*. 2005. 47(5): p. 467-78.
135. Chen Z.; Morgan R.; Berger C.S. & Sandberg A.A. Application of fluorescence in situ hybridization in hematological disorders. *Cancer Genet Cytogenet*. 1992. 63(1): p. 62-9.
136. Richards S.J. & Jack A.S. The development of integrated haematopathology laboratories: a new approach to the diagnosis of leukaemia and lymphoma. *Clin Lab Haematol*. 2003. 25(6): p. 337-42.
137. Dunphy C. & Tang W. Usefulness of routine conventional cytogenetic analysis in tissues submitted for "lymphoma work-up". *Leuk Lymphoma*. 2008. 49(1): p. 75-80.
138. Wilkens L.; Gerr H.; Gadzicki D.; Kreipe H. & Schlegelberger B. Standardised fluorescence in situ hybridisation in cytological and histological specimens. *Virchows Arch*. 2005. 447(3): p. 586-92.
139. Buno I.; Nava P.; Alvarez-Doval A.; Alvarez-Rodriguez F.; Diez-Martin J.L. & Menarguez J. Lymphoma associated chromosomal abnormalities can easily be detected by FISH on tissue imprints. An underused diagnostic alternative. *J Clin Pathol*. 2005. 58(6): p. 629-33.
140. Matsumoto Y.; Nomura K.; Matsumoto S.; Ueda K.; Nakao M.; Nishida K.; Sakabe H.; Yokota S.; Horiike S.; Nakamine H.; Nakamura S. & Taniwaki M. Detection of t(14;18) in follicular lymphoma by dual-color fluorescence in situ hybridization on paraffin-embedded tissue sections. *Cancer Genet Cytogenet*. 2004. 150(1): p. 22-6.
141. Barrans S.L.; Evans P.A.; O'Connor S.J.; Owen R.G.; Morgan G.J. & Jack A.S. The detection of t(14;18) in archival lymph nodes: development of a fluorescence in situ hybridization (FISH)-based method and evaluation by comparison with polymerase chain reaction. *J Mol Diagn*. 2003. 5(3): p. 168-75.

142. Paternoster S.F.; Brockman S.R.; McClure R.F.; Remstein E.D.; Kurtin P.J. & Dewald G.W. A new method to extract nuclei from paraffin-embedded tissue to study lymphomas using interphase fluorescence in situ hybridization. *Am J Pathol.* 2002. 160(6): p. 1967-72.
143. Haralambieva E.; Kleiverda K.; Mason D.Y.; Schuurin E. & Kluin P.M. Detection of three common translocation breakpoints in non-Hodgkin's lymphomas by fluorescence in situ hybridization on routine paraffin-embedded tissue sections. *J Pathol.* 2002. 198(2): p. 163-70.
144. Nagele R.; Freeman T.; McMorrow L. & Lee H.Y. Precise spatial positioning of chromosomes during prometaphase: evidence for chromosomal order. *Science.* 1995. 270(5243): p. 1831-5.
145. 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(1): p. 31-8.
146. Remstein E.D.; Kurtin P.J.; Buno I.; Bailey R.J.; Proffitt J.; Wyatt W.A.; Hanson C.A. & Dewald G.W. Diagnostic utility of fluorescence in situ hybridization in mantle-cell lymphoma. *Br J Haematol.* 2000. 110(4): p. 856-62.
147. Safley A.M.; Buckley P.J.; Creager A.J.; Dash R.C.; Dodd L.G.; Goodman B.K.; Jones C.K.; Lagoo A.S.; Stenzel T.T.; Wang W.; Xie B. & Gong J.Z. The value of fluorescence in situ hybridization and polymerase chain reaction in the diagnosis of B-cell non-Hodgkin lymphoma by fine-needle aspiration. *Arch Pathol Lab Med.* 2004. 128(12): p. 1395-403.
148. Zinkel S.; Gross A. & Yang E. BCL2 family in DNA damage and cell cycle control. *Cell Death Differ.* 2006. 13(8): p. 1351-9.
149. Tekola P.; Zhu Q. & Baak J.P. Confocal laser microscopy and image processing for three-dimensional microscopy: technical principles and an application to breast cancer. *Hum Pathol.* 1994. 25(1): p. 12-21.
150. Leers M.P.; Schutte B.; Theunissen P.H.; Ramaekers F.C. & Nap M. Heat pretreatment increases resolution in DNA flow cytometry of paraffin-embedded tumor tissue. *Cytometry.* 1999. 35(3): p. 260-6.
151. Thompson J.S.; Virtanen I. & Lehto V.P. Intermediate filaments in normal tissues and lymphomas of northern pike, *Esox lucius L.*, from the Aland Islands of Finland. *J Comp Pathol.* 1987. 97(3): p. 257-66.
152. Kodet R.; Mrhalova M.; Krskova L. & Stejskalova E. [Anaplastic large-cell lymphoma: review]. *Cesk Patol.* 2003. 39(3): p. 102-14.
153. Hirose Y.; Masaki Y. & Ozaki M. Fluorescence in situ hybridization detection of chromosome IGH/BCL2 translocations from paraffin-embedded tissue: evaluation in follicular lymphoma. *Int J Hematol.* 2003. 78(2): p. 154-9.
154. Nomura K.; Yoshino T.; Nakamura S.; Akano Y.; Tagawa H.; Nishida K.; Seto M.; Ueda R.; Yamagishi H. & Taniwaki M. Detection of t(11;18)(q21;q21) in marginal zone lymphoma of mucosa-associated lymphocytic tissue type on paraffin-embedded tissue sections by using fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genet Cytogenet.* 2003. 140(1): p. 49-54.
155. Tomita N.; Nakamura N.; Kanamori H.; Fujimaki K.; Fujisawa S.; Ishigatsubo Y. & Nomura K. Atypical Burkitt lymphoma arising from follicular lymphoma: demonstration by polymerase chain reaction following laser capture microdissection and by fluorescence in situ hybridization on paraffin-embedded tissue sections. *Am J Surg Pathol.* 2005. 29(1): p. 121-4.

156. Lu Y.J.; Birdsall S.; Summersgill B.; Smedley D.; Osin P.; Fisher C. & Shipley J. Dual colour fluorescence in situ hybridization to paraffin-embedded samples to deduce the presence of the der(X)t(X;18)(p11.2;q11.2) and involvement of either the SSX1 or SSX2 gene: a diagnostic and prognostic aid for synovial sarcoma. *J Pathol.* 1999. 187(4): p. 490-6.
157. Nomura S.; Ishii K.; Shimamoto Y.; Yamamoto Y. & Kadota E. Burkitt lymphoma of the uterus in a human T lymphotropic virus type-1 carrier. *Intern Med.* 2006. 45(4): p. 215-7.
158. Sekiguchi N.; Kobayashi Y.; Yokota Y.; Kusumoto S.; Tanimoto K.; Watanabe T.; Matsuno Y. & Tobinai K. Follicular lymphoma subgrouping by fluorescence in situ hybridization analysis. *Cancer Sci.* 2005. 96(2): p. 77-82.
159. Kitayama Y.; Igarashi H.; Kozu T.; Nagura K.; Ohashi Y. & Sugimura H. Repeated fluorescence in situ hybridization by a microwave-enhanced protocol. *Pathol Int.* 2006. 56(9): p. 490-3.
160. Li J.Y.; Gaillard F.; Moreau A.; Harousseau J.L.; Laboisie C.; Milpied N.; Bataille R. & Avet-Loiseau H. Detection of translocation t(11;14)(q13;q32) in mantle cell lymphoma by fluorescence in situ hybridization. *Am J Pathol.* 1999. 154(5): p. 1449-52.
161. Zilmer M.; Harris C.P.; Steiner D.S. & Meisner L.F. Use of nonbreakpoint DNA probes to detect the t(X;18) in interphase cells from synovial sarcoma: implications for detection of diagnostic tumor translocations. *Am J Pathol.* 1998. 152(5): p. 1171-7.
162. Reichard K.K.; Hall B.K.; Corn A.; Foucar M.K. & Hozier J. Automated analysis of fluorescence in situ hybridization on fixed, paraffin-embedded whole tissue sections in B-cell lymphoma. *Mod Pathol.* 2006. 19(8): p. 1027-33.
163. Watters A.D. & Bartlett J.M. Fluorescence in situ hybridization in paraffin tissue sections: pretreatment protocol. *Mol Biotechnol.* 2002. 21(3): p. 217-20.
164. Kan R.K.; Pleva C.M.; Hamilton T.A. & Petrali J.P. Immunolocalization of MAP-2 in routinely formalin-fixed, paraffin-embedded guinea pig brain sections using microwave irradiation: a comparison of different combinations of antibody clones and antigen retrieval buffer solutions. *Microsc Microanal.* 2005. 11(2): p. 175-80.
165. Plenat F.; Montagne K.; Weinbreck N.; Corby S.; Champigneulle J.; Antunes L.; Bonnet C.; Maire C. & Monhoven N. [Molecular consequences of fixation and tissue processing: the examples of nucleic acids and proteins]. *Ann Pathol.* 2006. 26(1): p. 8-21.
166. Tojo M.; Perez-Becerra R.; Vazquez-Boquete A.; Garcia-Rivero A.; Garcia-Caballero T.; Forteza J. & Fraga M. Looking for ferns: optimization of digestion pretreatment in fluorescence in situ hybridization (FISH) technique on paraffin-embedded tissues. *Diagn Mol Pathol.* 2008. 17(1): p. 59-63.
167. Pelluard-Nehme F.; Dupont T.; Turmo M.; Merlio J.P. & Belaud-Rotureau M.A. [Optimized protocols for interphase FISH analysis of imprints and sections using split signal probes]. *Morphologie.* 2007. 91(292): p. 52-60.
168. Alpar D.; Hermes J.; Poto L.; Laszlo R.; Kereskai L.; Jakso P.; Pajor G.; Pajor L. & Kajtar B. Automated FISH analysis using dual-fusion and break-apart probes on paraffin-embedded tissue sections. *Cytometry A.* 2008. 73(7): p. 651-7.
169. Pezzella F.; Ralfkiaer E.; Gatter K.C. & Mason D.Y. The 14;18 translocation in European cases of follicular lymphoma: comparison of Southern blotting and the polymerase chain reaction. *Br J Haematol.* 1990. 76(1): p. 58-64.

170. Liu J.; Johnson R.M. & Traweek S.T. Rearrangement of the BCL-2 gene in follicular lymphoma. Detection by PCR in both fresh and fixed tissue samples. *Diagn Mol Pathol*. 1993. 2(4): p. 241-7.
171. Berinstein N.L.; Jamal H.H.; Kuzniar B.; Klock R.J. & Reis M.D. Sensitive and reproducible detection of occult disease in patients with follicular lymphoma by PCR amplification of t(14;18) both pre- and post-treatment. *Leukemia*. 1993. 7(1): p. 113-9.
172. Horsman D.E.; Gascoyne R.D.; Coupland R.W.; Coldman A.J. & Adomat S.A. Comparison of cytogenetic analysis, southern analysis, and polymerase chain reaction for the detection of t(14; 18) in follicular lymphoma. *Am J Clin Pathol*. 1995. 103(4): p. 472-8.
173. Shibata D.; Hu E.; Weiss L.M.; Brynes R.K. & Nathwani B.N. Detection of specific t(14;18) chromosomal translocations in fixed tissues. *Hum Pathol*. 1990. 21(2): p. 199-203.
174. Barrans S.L.; Evans P.A.; O'Connor S.J.; Kendall S.J.; Owen R.G.; Haynes A.P.; Morgan G.J. & Jack A.S. The t(14;18) is associated with germinal center-derived diffuse large B-cell lymphoma and is a strong predictor of outcome. *Clin Cancer Res*. 2003. 9(6): p. 2133-9.
175. Belaud-Rotureau M.A.; Parrens M.; Dubus P.; Garroste J.C.; de Mascarel A. & Merlio J.P. A comparative analysis of FISH, RT-PCR, PCR, and immunohistochemistry for the diagnosis of mantle cell lymphomas. *Mod Pathol*. 2002. 15(5): p. 517-25.
176. Belaud-Rotureau M.A.; Parrens M.; Carrere N.; Turmo M.; Ferrer J.; de Mascarel A.; Dubus P. & Merlio J.P. Interphase fluorescence in situ hybridization is more sensitive than BIOMED-2 polymerase chain reaction protocol in detecting IGH-BCL2 rearrangement in both fixed and frozen lymph node with follicular lymphoma. *Hum Pathol*. 2007. 38(2): p. 365-72.
177. Deghiedy H.; Fouda M.; Shahin D.; Shamaa S.; El-Bedewy A. & Abd El-Ghaffar H. Diagnostic and prognostic utility of t(14;18) in follicular lymphoma. *Acta Haematol*. 2007. 118(4): p. 231-6.
178. Shaminie J.; Peh S.C. & Tan M.J. Improvement in the detection rate of t(14;18) translocation on paraffin-embedded tissue: a combination approach using PCR and FISH. *Pathology*. 2003. 35(5): p. 414-21.
179. Hockenbery D.M.; Zutter M.; Hickey W.; Nahm M. & Korsmeyer S.J. BCL2 protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991. 88(16): p. 6961-5.
180. Bentley G.; Palutke M. & Mohamed A.N. Variant t(14;18) in malignant lymphoma: a report of seven cases. *Cancer Genet Cytogenet*. 2005. 157(1): p. 12-7.
181. Richmond J.; Bryant R.; Trotman W.; Beatty B. & Lunde J. FISH detection of t(14;18) in follicular lymphoma on Papanicolaou-stained archival cytology slides. *Cancer*. 2006. 108(3): p. 198-204.
182. Bernicot I.; Douet-Guilbert N.; Le Bris M.J.; Morice P.; Abgrall J.F.; Berthou C.; Morel F. & De Braekeleer M. Characterization of IGH rearrangements in non-Hodgkin's B-cell lymphomas by fluorescence in situ hybridization. *Anticancer Res*. 2005. 25(5): p. 3179-82.
183. Radojkovic M.; Ristic S.; Colovic M.; Cemerikic-Martinovic V.; Radojkovic D. & Krtolica K. Molecular characteristics and prognostic significance of Bcl-2/IgH gene rearrangement in Serbian follicular lymphoma patients. *Neoplasma*. 2008. 55(5): p. 421-7.

184. Bende R.J.; Smit L.A. & van Noesel C.J. Molecular pathways in follicular lymphoma. *Leukemia*. 2007. 21(1): p. 18-29.
185. Loke S.L.; Pittaluga S.; Srivastava G.; Raffeld M. & Ho F.C. Translocation of bcl-2 gene in non-Hodgkin's lymphomas in Hong Kong Chinese. *Br J Haematol*. 1990. 76(1): p. 65-9.
186. Chen S.J.; Zelent A.; Tong J.H.; Yu H.Q.; Wang Z.Y.; Derre J.; Berger R.; Waxman S. & Chen Z. Rearrangements of the retinoic acid receptor alpha and promyelocytic leukemia zinc finger genes resulting from t(11;17)(q23;q21) in a patient with acute promyelocytic leukemia. *J Clin Invest*. 1993. 91(5): p. 2260-7.
187. Chen C.S.; Sorensen P.H.; Domer P.H.; Reaman G.H.; Korsmeyer S.J.; Heerema N.A.; Hammond G.D. & Kersey J.H. Molecular rearrangements on chromosome 11q23 predominate in infant acute lymphoblastic leukemia and are associated with specific biologic variables and poor outcome. *Blood*. 1993. 81(9): p. 2386-93.
188. Osborne C.K.; Norton L.; Young R.C.; Garvin A.J.; Simon R.M.; Berard C.W.; Hubbard S. & DeVita V.T., Jr. Nodular histiocytic lymphoma: an aggressive nodular lymphoma with potential for prolonged disease-free survival. *Blood*. 1980. 56(1): p. 98-103.
189. Rodriguez J.; McLaughlin P.; Hagemester F.B.; Fayad L.; Rodriguez M.A.; Santiago M.; Hess M.; Romaguera J. & Cabanillas F. Follicular large cell lymphoma: an aggressive lymphoma that often presents with favorable prognostic features. *Blood*. 1999. 93(7): p. 2202-7.
190. Borovecki A.; Korac P.; Nola M.; Ivankovic D.; Jaksic B. & Dominis M. Prognostic significance of B-cell differentiation genes encoding proteins in diffuse large B-cell lymphoma and follicular lymphoma grade 3. *Croat Med J*. 2008. 49(5): p. 625-35.
191. Bosga-Bouwer A.G.; van Imhoff G.W.; Boonstra R.; van der Veen A.; Haralambieva E.; van den Berg A.; de Jong B.; Krause V.; Palmer M.C.; Coupland R.; Kluin P.M.; van den Berg E. & Poppema S. Follicular lymphoma grade 3B includes 3 cytogenetically defined subgroups with primary t(14;18), 3q27, or other translocations: t(14;18) and 3q27 are mutually exclusive. *Blood*. 2003. 101(3): p. 1149-54.
192. Hans C.P.; Weisenburger D.D.; Vose J.M.; Hock L.M.; Lynch J.C.; Aoun P.; Greiner T.C.; Chan W.C.; Bociek R.G.; Bierman P.J. & Armitage J.O. A significant diffuse component predicts for inferior survival in grade 3 follicular lymphoma, but cytologic subtypes do not predict survival. *Blood*. 2003. 101(6): p. 2363-7.
193. Lossos I.S.; Alizadeh A.A.; Diehn M.; Warnke R.; Thorstenson Y.; Oefner P.J.; Brown P.O.; Botstein D. & Levy R. Transformation of follicular lymphoma to diffuse large-cell lymphoma: alternative patterns with increased or decreased expression of c-myc and its regulated genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002. 99(13): p. 8886-91.
194. Karube K.; Ying G.; Tagawa H.; Niino D.; Aoki R.; Kimura Y.; Hashikawa K.; Suefuji N.; Sugita Y.; Nomura Y.; Shimizu K.; Yoshida S.; Seto M. & Ohshima K. BCL6 gene amplification/3q27 gain is associated with unique clinicopathological characteristics among follicular lymphoma without BCL2 gene translocation. *Mod Pathol*. 2008. 21(8): p. 973-8.
195. Macintyre E.; Willerford D. & Morris S.W. Non-Hodgkin's Lymphoma: Molecular Features of B Cell Lymphoma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2000: p. 180-204.

196. Haldar S.; Beatty C.; Tsujimoto Y. & Croce C.M. The bcl-2 gene encodes a novel G protein. *Nature*. 1989. 342(6246): p. 195-8.
197. Pezzella F.; Jones M.; Ralfkiaer E.; Ersboll J.; Gatter K.C. & Mason D.Y. Evaluation of bcl-2 protein expression and 14;18 translocation as prognostic markers in follicular lymphoma. *Br J Cancer*. 1992. 65(1): p. 87-9.
198. Wong N.; Wong K.F.; Chan J.K. & Johnson P.J. Chromosomal translocations are common in natural killer-cell lymphoma/leukemia as shown by spectral karyotyping. *Hum Pathol*. 2000. 31(6): p. 771-4.
199. Rantanen S.; Monni O.; Joensuu H.; Franssila K. & Knuutila S. Causes and consequences of BCL2 overexpression in diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma*. 2001. 42(5): p. 1089-98.
200. Pegoraro L.; Palumbo A.; Erikson J.; Falda M.; Giovanazzo B.; Emanuel B.S.; Rovera G.; Nowell P.C. & Croce C.M. A 14;18 and an 8;14 chromosome translocation in a cell line derived from an acute B-cell leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1984. 81(22): p. 7166-70.
201. Vaandrager J.W.; Schuurin E.; Raap T.; Philippon K.; Kleiverda K. & Kluin P. Interphase FISH detection of BCL2 rearrangement in follicular lymphoma using breakpoint-flanking probes. *Genes Chromosomes Cancer*. 2000. 27(1): p. 85-94.
202. Logsdon M.D.; Meyn R.E., Jr.; Besa P.C.; Pugh W.C.; Stephens L.C.; Peters L.J.; Milas L.; Cox J.D.; Cabanillas F.; Brisbay S.; Andersen M. & McDonnell T.J. Apoptosis and the Bcl-2 gene family -- patterns of expression and prognostic value in stage I and II follicular center lymphoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1999. 44(1): p. 19-29.
203. Johnson A.; Brun A.; Dictor M.; Rambech E.; Akerman M. & Anderson H. Incidence and prognostic significance of t(14;18) translocation in follicle center cell lymphoma of low and high grade. A report from southern Sweden. *Ann Oncol*. 1995. 6(8): p. 789-94.
204. Yunis J.J.; Mayer M.G.; Arnesen M.A.; Aeppli D.P.; Oken M.M. & Frizzera G. bcl-2 and other genomic alterations in the prognosis of large-cell lymphoma. *N Engl J Med*. 1989. 320(16): p. 1047-54.
205. Sriganeshan V.; Blom T.R. & Weissmann D.J. A unique case of mantle cell lymphoma with an aberrant CD5-/CD10+ immunophenotype and typical morphology. *Arch Pathol Lab Med*. 2008. 132(8): p. 1346-9.
206. Obrador-Hevia A.; Mattos S.F.; Villalonga P. & Rodriguez J. Molecular biology of mantle cell lymphoma: From profiling studies to new therapeutic strategies. *Blood Rev*. 2009.
207. Hui P.; Howe J.G.; Crouch J.; Nimmakayalu M.; Qumsiyeh M.B.; Tallini G.; Flynn S.D. & Smith B.R. Real-time quantitative RT-PCR of cyclin D1 mRNA in mantle cell lymphoma: comparison with FISH and immunohistochemistry. *Leuk Lymphoma*. 2003. 44(8): p. 1385-94.
208. Hunt K.E.; Reichard K.K. & Wilson C.S. Mantle cell lymphoma lacking the t(11;14) translocation: a case report and brief review of the literature. *J Clin Pathol*. 2008. 61(7): p. 869-70.
209. Salaverria I.; Espinet B.; Carrio A.; Costa D.; Astier L.; Slotta-Huspenina J.; Quintanilla-Martinez L.; Fend F.; Sole F.; Colomer D.; Serrano S.; Miro R.; Bea S. & Campo E. Multiple recurrent chromosomal breakpoints in mantle cell lymphoma revealed by a combination of molecular cytogenetic techniques. *Genes Chromosomes Cancer*. 2008. 47(12): p. 1086-97.

210. Rosenwald A.; Wright G.; Wiestner A.; Chan W.C.; Connors J.M.; Campo E.; Gascoyne R.D.; Grogan T.M.; Muller-Hermelink H.K.; Smeland E.B.; Chiorazzi M.; Giltzane J.M.; Hurt E.M.; Zhao H.; Averett L.; Henrickson S.; Yang L.; Powell J.; Wilson W.H.; Jaffe E.S.; Simon R.; Klausner R.D.; Montserrat E.; Bosch F.; Greiner T.C.; Weisenburger D.D.; Sanger W.G.; Dave B.J.; Lynch J.C.; Vose J.; Armitage J.O.; Fisher R.I.; Miller T.P.; LeBlanc M.; Ott G.; Kvaloy S.; Holte H.; Delabie J. & Staudt L.M. The proliferation gene expression signature is a quantitative integrator of oncogenic events that predicts survival in mantle cell lymphoma. *Cancer Cell*. 2003. 3(2): p. 185-97.
211. Yatabe Y.; Suzuki R.; Tobinai K.; Matsuno Y.; Ichinohasama R.; Okamoto M.; Yamaguchi M.; Tamaru J.; Uike N.; Hashimoto Y.; Morishima Y.; Suchi T.; Seto M. & Nakamura S. Significance of cyclin D1 overexpression for the diagnosis of mantle cell lymphoma: a clinicopathologic comparison of cyclin D1-positive MCL and cyclin D1-negative MCL-like B-cell lymphoma. *Blood*. 2000. 95(7): p. 2253-61.
212. Kai Fu D.D.W., Timothy C. Greiner, Sandeep Dave, George Wright, Andreas Rosenwald, Michael Chiorazzi, Javeed Iqbal S.G., Reiner Siebert, Daphne De Jong, Elaine S. Jaffe, Wyndham H. Wilson, Jan Delabie, German Ott, Bhavana J. Dave W.G.S., Lynette M. Smith, Lisa Rimsza, Rita M. Braziel, H. Konrad Müller-Hermelink, Elias Campo, & Randy D. Gascoyne L.M.S., and Wing C. Chan. Cyclin D1-negative mantle cell lymphoma: a clinicopathologic study based on gene expression profiling. *Blood*. 2005. 106(13): p. 4315-4320.
213. Shui R.H.; Yang W.T.; Sun M.H.; Shi D.R. & Zhu X.Z. [Detection of cyclin D1 protein expression and t(11;14) chromosomal translocation in paraffin-embedded tissues and its clinicopathologic significance for mantle cell lymphoma]. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi*. 2003. 32(4): p. 337-41.
214. Kohlhammer H.; Schwaenen C.; Wessendorf S.; Holzmann K.; Kestler H.A.; Kienle D.; Barth T.F.; Moller P.; Ott G.; Kalla J.; Radlwimmer B.; Pscherer A.; Stilgenbauer S.; Dohner H.; Lichter P. & Bentz M. Genomic DNA-chip hybridization in t(11;14)-positive mantle cell lymphomas shows a high frequency of aberrations and allows a refined characterization of consensus regions. *Blood*. 2004. 104(3): p. 795-801.
215. Lopez-Guillermo A.; Colomo L.; Jimenez M.; Bosch F.; Villamor N.; Arenillas L.; Muntanola A.; Montoto S.; Gine E.; Colomer D.; Bea S.; Campo E. & Montserrat E. Diffuse large B-cell lymphoma: clinical and biological characterization and outcome according to the nodal or extranodal primary origin. *J Clin Oncol*. 2005. 23(12): p. 2797-804.
216. Hans C.P.; Weisenburger D.D.; Greiner T.C.; Gascoyne R.D.; Delabie J.; Ott G.; Muller-Hermelink H.K.; Campo E.; Braziel R.M.; Jaffe E.S.; Pan Z.; Farinha P.; Smith L.M.; Falini B.; Banham A.H.; Rosenwald A.; Staudt L.M.; Connors J.M.; Armitage J.O. & Chan W.C. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood*. 2004. 103(1): p. 275-82.
217. Shipp M.A.; Ross K.N.; Tamayo P.; Weng A.P.; Kutok J.L.; Aguiar R.C.; Gaasenbeek M.; Angelo M.; Reich M.; Pinkus G.S.; Ray T.S.; Koval M.A.; Last K.W.; Norton A.; Lister T.A.; Mesirov J.; Neuberg D.S.; Lander E.S.; Aster J.C. & Golub T.R. Diffuse large B-cell lymphoma outcome prediction by gene-expression profiling and supervised machine learning. *Nat Med*. 2002. 8(1): p. 68-74.

218. Le Gouill S.; Talmant P.; Touzeau C.; Moreau A.; Garand R.; Juge-Morineau N.; Gaillard F.; Gastinne T.; Milpied N.; Moreau P.; Harousseau J.L. & Avet-Loiseau H. The clinical presentation and prognosis of diffuse large B-cell lymphoma with t(14;18) and 8q24/c-MYC rearrangement. *Haematologica*. 2007. 92(10): p. 1335-42.
219. Yoon S.O.; Jeon Y.K.; Paik J.H.; Kim W.Y.; Kim Y.A.; Kim J.E. & Kim C.W. MYC translocation and an increased copy number predict poor prognosis in adult diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), especially in germinal centre-like B cell (GCB) type. *Histopathology*. 2008. 53(2): p. 205-17.
220. Vitolo U.; Gaidano G.; Botto B.; Volpe G.; Audisio E.; Bertini M.; Calvi R.; Freilone R.; Novero D.; Orsucci L.; Pastore C.; Capello D.; Parvis G.; Sacco C.; Zagonel V.; Carbone A.; Mazza U.; Palestro G.; Saglio G. & Resegotti L. Rearrangements of bcl-6, bcl-2, c-myc and 6q deletion in B-diffuse large-cell lymphoma: clinical relevance in 71 patients. *Ann Oncol*. 1998. 9(1): p. 55-61.
221. Dallas P.B.; Lyons P.A.; Hudson J.B.; Scalzo A.A. & Shellam G.R. Identification and characterization of a murine cytomegalovirus gene with homology to the UL25 open reading frame of human cytomegalovirus. *Virology*. 1994. 200(2): p. 643-50.
222. Volpe G.; Vitolo U.; Carbone A.; Pastore C.; Bertini M.; Botto B.; Audisio E.; Freilone R.; Novero D.; Cappia S.; De Giuli P.; Mazza U.; Resegotti L.; Palestro G.; Saglio G. & Gaidano G. Molecular heterogeneity of B-lineage diffuse large cell lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer*. 1996. 16(1): p. 21-30.
223. Offit K.; Lo Coco F.; Louie D.C.; Parsa N.Z.; Leung D.; Portlock C.; Ye B.H.; Lista F.; Filippa D.A.; Rosenbaum A. & et al. Rearrangement of the bcl-6 gene as a prognostic marker in diffuse large-cell lymphoma. *N Engl J Med*. 1994. 331(2): p. 74-80.
224. Muramatsu M.; Akasaka T.; Kadowaki N.; Ohno H.; Yamabe H.; Edamura S.; Dor S.; Mori T.; Okuma M. & Fukuhara S. Rearrangement of the BCL6 gene in B-cell lymphoid neoplasms: comparison with lymphomas associated with BCL2 rearrangement. *Br J Haematol*. 1996. 93(4): p. 911-20.
225. Tibiletti M.G.; Martin V.; Bernasconi B.; Del Curto B.; Pecciarini L.; Uccella S.; Pruneri G.; Ponzoni M.; Mazzucchelli L.; Martinelli G.; Ferreri A.J.; Pinotti G.; Assanelli A.; Scandurra M.; Doglioni C.; Zucca E.; Capella C. & Bertoni F. BCL2, BCL6, MYC, MALT 1, and BCL10 rearrangements in nodal diffuse large B-cell lymphomas: a multicenter evaluation of a new set of fluorescent in situ hybridization probes and correlation with clinical outcome. *Hum Pathol*. 2009.
226. Iqbal J.; Neppalli V.T.; Wright G.; Dave B.J.; Horsman D.E.; Rosenwald A.; Lynch J.; Hans C.P.; Weisenburger D.D.; Greiner T.C.; Gascoyne R.D.; Campo E.; Ott G.; Muller-Hermelink H.K.; Delabie J.; Jaffe E.S.; Grogan T.M.; Connors J.M.; Vose J.M.; Armitage J.O.; Staudt L.M. & Chan W.C. BCL2 expression is a prognostic marker for the activated B-cell-like type of diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol*. 2006. 24(6): p. 961-8.
227. Gaidano G.; Pastore C.; Gloghini A.; Canzonieri V.; Capello D.; Franceschi S.; Saglio G. & Carbone A. Genetic heterogeneity of AIDS-related small non-cleaved cell lymphoma. *Br J Haematol*. 1997. 98(3): p. 726-32.
228. Gascoyne R.D. Hematopathology approaches to diagnosis and prognosis of indolent B-cell lymphomas. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2005: p. 299-306.
229. Hermine O.; Haioun C.; Lepage E.; d'Agay M.F.; Briere J.; Lavignac C.; Fillet G.; Salles G.; Marolleau J.P.; Diebold J.; Reyas F. & Gaulard P. Prognostic

- significance of bcl-2 protein expression in aggressive non-Hodgkin's lymphoma. Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte (GELA). *Blood*. 1996. 87(1): p. 265-72.
230. Hill M.E.; MacLennan K.A.; Cunningham D.C.; Vaughan Hudson B.; Burke M.; Clarke P.; Di Stefano F.; Anderson L.; Vaughan Hudson G.; Mason D.; Selby P. & Linch D.C. Prognostic significance of BCL-2 expression and bcl-2 major breakpoint region rearrangement in diffuse large cell non-Hodgkin's lymphoma: a British National Lymphoma Investigation Study. *Blood*. 1996. 88(3): p. 1046-51.
231. Tang S.C.; Visser L.; Hepperle B.; Hanson J. & Poppema S. Clinical significance of bcl-2-MBR gene rearrangement and protein expression in diffuse large-cell non-Hodgkin's lymphoma: an analysis of 83 cases. *J Clin Oncol*. 1994. 12(1): p. 149-54.
232. Verma R.S. & Pulivarthi R.H. Balanced chromosomal translocations and mental illness. *J Ment Defic Res*. 1991. 35 (Pt 6): p. 548-50.
233. Boonstra R.; Bosga-Bouwer A.; Mastik M.; Haralambieva E.; Conradie J.; van den Berg E.; van den Berg A. & Poppema S. Identification of chromosomal copy number changes associated with transformation of follicular lymphoma to diffuse large B-cell lymphoma. *Hum Pathol*. 2003. 34(9): p. 915-23.
234. Xu Y.; McKenna R.W.; Doolittle J.E.; Hladik C.L. & Kroft S.H. The t(14;18) in diffuse large B-cell lymphoma: correlation with germinal center-associated markers and clinical features. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2005. 13(2): p. 116-23.
235. Abd El-Hameed A. De novo nodal diffuse large B-cell lymphoma: identification of biologic prognostic factors. *J Egypt Natl Canc Inst*. 2005. 17(1): p. 20-8.
236. Berglund M.; Thunberg U.; Amini R.M.; Book M.; Roos G.; Erlanson M.; Linderöth J.; Dictor M.; Jerkeman M.; Cavallin-Stahl E.; Sundstrom C.; Rehn-Eriksson S.; Backlin C.; Hagberg H.; Rosenquist R. & Enblad G. Evaluation of immunophenotype in diffuse large B-cell lymphoma and its impact on prognosis. *Mod Pathol*. 2005. 18(8): p. 1113-20.
237. Biasoli I.; Morais J.C.; Scheliga A.; Milito C.B.; Romano S.; Land M.; Pulcheri W. & Spector N. CD10 and Bcl-2 expression combined with the International Prognostic Index can identify subgroups of patients with diffuse large-cell lymphoma with very good or very poor prognoses. *Histopathology*. 2005. 46(3): p. 328-33.
238. Barrans S.L.; O'Connor S.J.; Evans P.A.; Davies F.E.; Owen R.G.; Haynes A.P.; Morgan G.J. & Jack A.S. 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(2): p. 322-32.
239. Chen Y.W.; Hu X.T.; Liang A.C.; Au W.Y.; So C.C.; Wong M.L.; Shen L.; Tao Q.; Chu K.M.; Kwong Y.L.; Liang R.H. & Srivastava G. High BCL6 expression predicts better prognosis, independent of BCL6 translocation status, translocation partner, or BCL6-deregulating mutations, in gastric lymphoma. *Blood*. 2006. 108(7): p. 2373-83.
240. Klapper W.; Stoecklein H.; Zeynalova S.; Ott G.; Kosari F.; Rosenwald A.; Loeffler M.; Trumper L.; Pfreundschuh M. & Siebert R. Structural aberrations affecting the MYC locus indicate a poor prognosis independent of clinical risk factors in diffuse large B-cell lymphomas treated within randomized trials of the German High-Grade Non-Hodgkin's Lymphoma Study Group (DSHNHL). *Leukemia*. 2008. 22(12): p. 2226-9.

241. McDonnell T.J. & Korsmeyer S.J. Progression from lymphoid hyperplasia to high-grade malignant lymphoma in mice transgenic for the t(14; 18). *Nature*. 1991. 349(6306): p. 254-6.