



Implicació de l'oncogen *MYC* en la patogènesi dels limfomes B agressius

Alexandra Valera Barros

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE BARCELONA

Facultat de Medicina

Departament d'Anatomia Patològica, Microbiologia i Farmacologia

Programa de Doctorat en Medicina

Tesi Doctoral:

**Implicació de l'oncogen *MYC* en la patogènesi
dels limfomes de cèl·lula B agressius**

Tesi presentada per

Alexandra Valera Barros

per optar al títol de **Doctora en Medicina**

Directors de la tesi:

Doctor Lluís Colomo Saperas

Professor Elies Campo Guerri

Barcelona, 2013

Als meus pares

Als patients

Agraïments

Aquesta tesi doctoral no hagués pogut ser possible sense l'ajuda de molta gent que ha estat al meu costat en els quatre anys que ha durat i per això vull donar-vos a tots les gràcies. Per començar m'agradaria agrair als meus directors de tesi que són els principals responsables que en aquests moments pugui escriure aquestes línies. Al Lluís Colomo que des del primer moment em va acollir com a doctoranda. Moltes gràcies Lluís per tot el que m'has ensenyat a nivell professional, també gràcies per la teva constància, paciència i sobretot la confiança dipositada em mi que ha fet que seguís el camí fins al final. A l'Elies Campo, no només per aquests quatre anys sinó també pels quatre anys anteriors que fa que ens coneixem des de que vaig començar a treballar a l'Hospital Clínic. Elies et vull agrair tant a nivell professional, per tot el que he après al teu costat, com també personal, per donar-me l'oportunitat de fer la tesi i preocupar-te en que pogués tenir una continuïtat en aquesta casa.

També vull donar les gràcies al Departament d'Anatomia Patològica per ensenyar-me tot el que ser i per fer-me sentir com a casa. Moltes gràcies primer al Toni, l'altre "limfomadicte" per la seva emoció científica que tant ens contagia a tots des del primer moment que ens sentem a mirar al microscopi, gràcies per no tenir mai un no, i també per les estones compartides fora de l'Hospital. Gràcies a la Llúcia per ensenyar-me a ser més pragmàtica i resolutiva, per comptar amb mi en els seus treballs científics, i per compartir estones de riure fora d'aquesta casa. Gràcies al Pedro Fernández per incorporar-me tant a la tasca assistencial com a la participació de treballs científics i docents. Gràcies al Jaume per la seva ajuda i per arrancar-me sempre, sempre, sempre un somriure! Gràcies a la Miriam per incloure'm als seus treballs i per la seva bona companyia a la sala de júnior. Gràcies també a la resta d'adjunts: a l'Alfons, el Manel, la Rosa, la Teresa, el Bombí, el Pedro Jares i la Carme per fer-me partícip de les sessions i activitats com una resident més. Gràcies sobretot al director del departament, al "Rami", per preocupar-se per mi i pel meu futur. I com no, moltes gràcies al professor Cardesa i al doctor Palacín.

Moltes gràcies a les tècnics de laboratori, principalment per la seva feina sempre tant eficient i professional com també la seva disposició a col·laborar. Moltes gràcies a l'Elena Gonzalvo, la Laura Gelabert i la Mònica Marín, a l'Ingrid Rubio, a l'Helena Rull, a l'Ingrid Victòria, a la Judit, a la Montse Tortosa, a la Rosana i a la Miriam.

Gràcies també a les citotècniques per estones compartides i galetes robades: a la Roser, la Teresa, la Fuencisla i a les noves incorporacions: a la Sílvia, al Paco i la Nayara. Sense oblidar tampoc a les "secres", la Marta i l'Olga i les superlalleres Gemma i Noe. Gràcies a la Natalhie per la seva ajuda. Gràcies també a la Luci, i la Teresa Roch per tots aquests anys.

Moltíssimes gràcies a la Carmen Muro i la Glòria per la vostra tasca però sobretot per la vostra amistat. Bé.....molt més que amistat, per mi les dues sou com unes segones mares.

Ara ve una de els parts més difícils per agrair, als "resis", alguns dels quals ja sou patòlegs o a punt de ser-ho. Nois no tinc paraules, potser és que en tinc tantes que no m'hi caben. Moltes gràcies a tots per adoptar-me i estimar-me, i per ser com sou. Gràcies a la Vicky, per la seva bondat i estimació; gràcies a la Sofia per ser així de carinyosa; gràcies a la Pao per

la seva dolçor; gràcies al Leo pels seus acudits i les boníssimes estones, gràcies a la Malu per la seva transparència, gràcies a la Blanca per la seva naturalitat, gràcies a la Belén pel seu gran companyerisme i sentit de l'humor, gràcies a l'Adela per la seva amabilitat i a l' Amaia per la seva alegria contagiosa. Gràcies també als penúltims i els nous: a l'Iban, la Laura, la Carla i el Jorge.

Per descomptat agrair als meus inestimables companys de la sala de Júniors. Començant per l'Olga, una de les meves millors amigues d'aquesta casa que malgrat la distància que ens separa, sempre aconseguim mantenir el contacte. Gràcies Olga per ensenyar-me tantes coses, sobretot a mantenir el somriure, l'alegria i esperança malgrat les adversitats. Gràcies a l'Anna Mozos, l'Adriana i l'Anna Petit per haver-me fet molt fàcil el treball plegades i per damunt de tot, gràcies per la vostra amistat. Gràcies a la Teresa, que ha sigut un com una co-R però de tesi. "Gracias Teresa simplemente por ser com eres: tenaz, trabajadora i muy cariñosa". Gràcies al Dani per transmetre'm la teva paciència i calma en tants moments necessaris. Moltíssimes gràcies Alba per....tot. Pel dia a dia, per la teva amistat i per deixar-me formar part de la teva família.

Treballar en aquest departament m'ha permès conèixer molta gent sobretot de fora del país. Moltes gràcies a tots els rotants amb els qui he tingut i tinc l'oportunitat de treballar i de conèixer personalment. Han estat molts però hi ha alguns amb els qui he tingut la sort de mantenir l' amistat: la Jazmín (Mèxic), la Nalan (Turquía), l'Ana María (Colòmbia), la Nhora (Colòmbia), la Luz (Colòmbia), l'Alejandra (Costa Rica), la Cati (Colòmbia), la Johanna (Colòmbia), l'Oscar (Colòmbia), la Yadira (Colòmbia), l'Edwin (Colòmbia), l'Ivan (Colòmbia), la Diana (Colòmbia), la Jéssica (Colòmbia), la Mònica (Costa Rica), el Ricardo (Xile) i el Ken (Japó). Però en especial a la Jana per haver conectat des del primer moment i per haver-me acollit entre la seva família a terres malaguenyes. I sobretot a dues persones que ja formen part del meu cercle d'amics més propers: la Mily (Panamà) i el Davide (Suïssa): "Chicos os quiero agradecer vuestra gran amistad que espero, que a pesar de la distancia y circunstancias, pueda mantenerse igual que ahora".

Voldria donar les gràcies a les meves mestres de citogenètica en aquesta casa: la Dolors i l'Ana. Primer de tot per el seu ensenyament, gràcies per haver pogut aprendre al vostre costat i per haver-me donat la gran oportunitat de fer les vostres suplències. Gràcies per haver dipositat la vostra confiança en mi. I també voldria agrair-vos a les dues la vostra amistat i incondicional ajuda. Com també vull agrair a l'Amparo, la Concha i la Candi, per la seva feina i la seva amistat. I també a la Cristina, pel seu gran entusiasme i la seva força.

M'agradia donar les gràcies a l'Escola d'Hematopatologia en particular a la Dolors, la Neus, el Josep lluís, la Marta i la Maruja. Als investigadors i tècnics del CEK: la Sílvia, la Iti, el Lluís, l'Iñaki, la Cristina, l'Alba, la Mònica, la Patricia, el Gaël, el Jordi, la Isa, la Carla, la Jara i la Miriam. Al servei d'Hematologia de l'hospital concretament a l'Armando per la seva feina i ajuda en els treballs de la tesi, i sobretot per la seva bona disposició a ensenyar-me el món complicat de l'estadística. També voldria agrair a altres hematòlegs amb els, que encara que no han participat d'una manera directe en aquesta tesi, si que vaig poder tenir l'oportunitat de

treballar plegats quan estava a Citogenètica: al Jordi, a l'Alvaro, l'Eva, l'Anna, la Carmen, la Laura i la Montse, pero sobretot i en especial al Benet.

Tampoc m'oblido del meu primer contacte en el món de la citogenètica que va ser a l'Hospital del Mar: moltes gràcies Kiko, Blanca i Marta per introduir-me en aquest món. També vull donar les gràcies a la Núria Cluselles per ensenyar-me citogenètica prenatal i a la Teresa Pàmpols per acollir-me a l'Instiut de Bioquímica Clínica. Moltes gràcies també al departament d'Hematologia de Can Ruti per el que em van ensenyar i per com de bé em van acollir, sobretot a l'Isabel Granada i al Jordi Juncà. Voldria agrair també la seva ajuda, suport i amistat a la Fina Climent de l'Hospital de Bellvitge.

No puc deixar d'agrair tampoc a tres persones que han sigut molt importants al llarg de la meva vida en l'àmbit educatiu. El primer de tots és el Carlos Carnicero per ensenyar-me unes bones bases educatives i sobretot i més important ensenyar-me que la vida no sempre és fàcil, amb la seva mítica frase "La vida es dura, chicos" però per la que val la pena lluitar fins al final. La segona persona es el Salvador Sarquella, que per a mi ha sigut la persona que em va fer estimar la Biologia i que gràcies a ell vaig escollir dedicar-m'hi professionalment. I el darrer, el professor Egozcue que es el principal responsable de la meva introducció i contacte amb la Citogenètica a la universitat.

Vull donar les gràcies també, als meus amics per la seva bona amistat, per estar al meu costat ens els bons i en els no tant bons moments, per fer-me riure, i inclús plorar de riure, per donar-me consells i fer-me feliç: a la Mar, al Lluís, al Jordan, a la Carme, a la Cristina, l'Eli i el Miquel, al Carlos, a la Laura, l'Esther, a l'Edgar, a la Izaskun, al Christopher. Al Guinter per estimar-me i ensenyar-me a perdre la por. Als meus amics i "tiets" Carlos y Dylan. I sobretot a la meva "germana postissa" i amiga de sempre i per sempre Vanessa.

Per acabar vull donar les gràcies a la meva família per cuidar-me i estimar-me tant: a la meva àvia, a la meva tieta, al Ramón, la Tere, la Laura, al Jordi i als petits la Júlia i el Jan. Com també, encara que allunyats per les circumstàncies, a la Maria Àngels, al Sergi i al Josep. Sense oblidar els que ja no estan amb nosaltres, sobretot a la iaia Maria i al tiet Paco. I als meus pares, als qui els dedico al tesi, per tot el que m'han ensenyat i el que han lluitat per mi., moltes gràcies.

Els treballs realitzats en aquesta tesi han rebut la següent financiació:

- “Red Temática de Investigación Cooperativa del Cáncer (RTICC)” (RD07/0020/2004) del Instituto de Salud Carlos III.
- “Red Temática de Investigación Cooperativa del Cáncer (RTICC)” (RD06/0020/0039) del Instituto de Salud Carlos III.
- “Red Temática de Investigación Cooperativa del Cáncer (RTICC)” (RD12/0036/0023) del Instituto de Salud Carlos III.
- “Red Temática de Investigación Cooperativa del Cáncer (RTICC)” (RD12/0036/0086) del Instituto de Salud Carlos III.
- “Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS)” (PI08/0095) del Instituto de Salud Carlos III, Ministerio Español de Salud.
- “Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS)” (PI12/01536) del Instituto de Salud Carlos III, Ministerio Español de Salud.
- “Asociación Española Contra el Cáncer (AECC)” AECC_07_011
- Ministerio español de Ciencia e Innovación SAF08/3630
- “Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología Española” (CYCT) SAF 12/38432
- “Conveni Programa de Feno/Genotipatge per al diagnòstic i tractament individualitzat del paciente oncològic, La Caixa”.

Treballs presentats en aquesta tesi doctoral

Treball 1:

Alexandra Valera, Armando López-Guillermo, Teresa Cardesa-Salzmann, Fina Climent, Eva González-Barca, Santiago Mercadal, Íñigo Espinosa, Silvana Novelli, Javier Briones, José L. Mate, Olga Salamero, Juan M. Sancho, Leonor Arenillas, Sergi Serrano, Nadina Erill, Daniel Martínez, Paola Castillo, Jordina Rovira, Antonio Martínez, Elias Campo and Luis Colomo; Grup per l'Estudi dels Limfomes de Catalunya i Balears (GELCAB): *MYC protein expression and genetic alterations have prognostic impact in diffuse large B-cell lymphoma treated with immunochemotherapy.*

Haematologica 2013; May 28 [Epub ahead of print]

Treball 2:

Alexandra Valera, Olga Balagué, Luis Colomo, Antonio Martínez, Jan Delabie, Lekidelu Taddesse-Heath, Elaine S. Jaffe, and Elias Campo: *IG/MYC rearrangements are the main cytogenetic alteration in plasmablastic lymphomas.*

American Journal of Surgical Pathology 2010; 34 (11): 1686-1694.

Treball 3:

Alexandra Valera, Lluís Colomo, Antonio Martínez, Daphne de Jong, Olga Balagué, Gabriel Matheu, Mónica Martínez, Lekidelu Taddesse-Heath, Elaine S. Jaffe, Carlos E. Bacchi and Elias Campo: *ALK-positive large B-cell lymphomas express a terminal B-cell differentiation program and activated STAT3 but lack MYC rearrangements.*

Modern Pathology 2013; April 19 [Epub ahead of print]

Altres estudis científics publicats ens els que he participat durant la realització d'aquesta tesi doctoral:

- Lujan B, Hakim S, Moyano S, Nadal A, Caballero M, Diaz A, **Valera A**, Carrera M, Cardesa A, Alos L. *Activation of the EGFR/ERK pathway in high-grade mucoepidermoid carcinomas of the salivary glands*. British Journal of Cancer 2010 Aug 10;103(4):510-6.

- Costa D, **Valera S**, Carrió A, Arias A, Muñoz C, Rozman M, Belkaid M, Coutinho R, Nomdedeu B, Campo E. *Do we need to do fluorescence in situ hybridization analysis in myelodysplastic syndromes as often as we do?* Leukemia Research 2010 Nov;34(11):1437-41.

- Fernández de Larrea C, Martínez-Pozo A, Mercadal S, García A, Gutierrez-García G, **Valera A**, Ghita G, Colomo L, Gainza E, Villamor N, Nomdedeu B, Estrach T, Montserrat E, Campo E, López-Guillermo A. *Initial features and outcome of cutaneous and non-cutaneous primary extranodal follicular lymphoma*. British Journal of Haematology 2011 May;153(3):334-40.

- Gutiérrez-García G, Cardesa-Salzmann T, Climent F, González-Barca E, Mercadal S, Mate JL, Sancho JM, Arenillas L, Serrano S, Escoda L, Martínez S, **Valera A**, Martínez A, Jares P, Pinyol M, García-Herrera A, Martínez-Trillos A, Giné E, Villamor N, Campo E, Colomo L, López-Guillermo A; Grup per l'Estudi dels Limfomes de Catalunya i Balears (GELCAB). *Gene-expression profiling and not immunophenotypic algorithms predicts prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with immunochemotherapy*. Blood 2011 May 5;117(18):4836-43.

- Díaz A, **Valera A**, Carrera C, Hakim S, Aguilera P, García A, Palou J, Puig S, Malveyh J, Alos L. *Pigmented spindle cell nevus: clues for differentiating it from spindle cell malignant melanoma. A comprehensive survey including clinicopathologic, immunohistochemical, and FISH studies*. American Journal of Surgical Pathology 2011 Nov;35(11):1733-42.

- Salaverria I, Royo C, Carvajal-Cuenca A, Clot G, Navarro A, **Valera A**, Song JY, Woroniecka R, Rymkiewicz G, Klapper W, Hartmann EM, Sujobert P, Wlodarska I, Ferry JA, Gaulard P, Ott G, Rosenwald A, Lopez-Guillermo A, Quintanilla-Martinez L, Harris NL, Jaffe ES, Siebert R, Campo E, Beà S. *CCND2 rearrangements are the most frequent genetic events in cyclin D1(-) mantle cell lymphoma*. Blood 2013 Feb 21;121(8):1394-402.

- Martinez D, **Valera A**, Perez NS, Sua Villegas LF, Gonzalez-Farre B, Sole C, Gine E, Lopez-Guillermo A, Roue G, Martinez S, Sant F, Warzocha K, Robak T, Czader M, Villamor N, Colomo L, Campo E, Martinez A. *Plasmablastic transformation of low-grade B-cell lymphomas: report on 6 cases*. American Journal of Surgical Pathology 2013 Feb;37(2):272-81.

- Soldini D, **Valera A**, Solé C, Palomero J, Amador V, Martin-Subero JI, Ribera-Cortada I, Royo C, Salaverria I, Beà S, Gonzalvo E, Johannesson H, Herrera M, Colomo L, Martinez A, Campo E. *Assessment of SOX11 expression in routine lymphoma tissue sections: characterization of new monoclonal antibodies for diagnosis of mantle cell lymphoma*. American Journal of Surgical Pathology 2013 acceptat (AJSP-D-13-00371R1).

ÍNDEX

Llista d'abreviacions utilitzades	19
Introducció	23
1.- Desenvolupament de la cèl·lula B i limfomagènesi	25
2.- Els limfomes B agressius	29
2.1.- Limfoma difús de cèl·lula gran B (DLBCL)	30
2.2.- Limfoma de Burkitt (BL)	36
2.3.- Limfoma de cèl·lula B, inclassificable, amb característiques intermèdies entre DLBCL i BL (BCLU)	39
2.4.- Limfoma plasmablàstic (PBL)	42
2.5.- Limfoma de cèl·lula B gran ALK positiu (ALK+ LBCL)	45
3.- MYC: gen i proteïna	47
4.- L'oncogen <i>MYC</i> en el desenvolupament de la cèl·lula B i a la limfomagènesi	49
5.- Desregulació de MYC en els limfomes B agressius	52
5.1.- MYC i el Limfoma difús de cèl·lula gran B	53
5.2.- MYC i el Limfoma de Burkitt	54
5.3.- MYC i el Limfoma de cèl·lula B, inclassificable, amb característiques intermèdies entre DLBCL i BL	57
5.4.- MYC i el Limfoma plasmablàstic	58
5.5.- MYC i el Limfoma de cèl·lula gran B ALK positiu	59
Hipòtesi de treball i objectius	61
Resultats	65
3.1.- Treball 1	67
3.2.- Treball 2	89
3.3.- Treball 3	103
Discussió	117
Conclusions	125
Bibliografia	129

Llista d'abreviacions utilitzades



ABC-DLBCL: DLBCL amb un perfil d'expressió gènica activat (de l'anglès *Activate B-cell DLBCL*)

Ag: Antigen

AID: citidina desaminasa (de l'anglès *Activation Induced cytidine Deaminase*)

ALK: receptor tirosina quinasa del limfoma anaplàsic (de l'anglès *Anaplastic Lymphoma receptor tyrosine Kinase*)

ALK+ LBCL: limfoma de cèl·lula gran B ALK positiu (de l'anglès *ALK+ Large B-Cell Lymphoma*)

ALK WT: forma no alterada d'ALK (de l'anglès, *wild type*)

ATR: gen de l'atàxia telangiectàsia i Rad3 (de l'anglès *Ataxia Telangiectasia and Rad3 related*)



BACH2: proteïna reguladora del factor de transcripció BACH2 (de l'anglès *BTB and CNC homology 1, basic leucine zipper transcription factor 2*)

BL: limfoma de Burkitt (de l'anglès *Burkitt Lymphoma*)

BCL2: gen de la cèl·lula B de la leucèmia/limfoma limfocítica crònica 2 (de l'anglès *B-Cell CLL/Lymphoma 2*)

BCL6: gen de la cèl·lula B de la leucèmia/limfoma limfocítica crònica 6 (de l'anglès *B-Cell CLL/Lymphoma 6*)

BCLU: limfoma de cèl·lula B, inclassificable, amb característiques intermèdies entre limfoma difús de cèl·lula gran B i limfoma de Burkitt (de l'anglès *B-Cell Lymphoma, Unclassifiable, with*

features intermediate between diffuse large B-cell lymphoma and Burkitt lymphoma)

BCR: receptor de cèl·lula B (de l'anglès *B-Cell Receptor*)

BIM: proteïna d'interacció amb BCL2 (de l'anglès *BCL2 Interacting Mediator of cell death*)

BLIMP1: proteïna amb domini dit de zenc rica en prolina i serina (de l'anglès *proline/serine rich domain zinc finger 1*)

BVR1 i BVR2: regió variant de Burkitt tipus 1 (de l'anglès *Burkitt Variant Region Type 1 and 2*)



CCND1 i 3: gen de la ciclina D1 i D3 (de l'anglès *Cyclin D1*)

CFD: Cèl·lula Fol·licular Dendrítica

CGH: hibridació genòmica comparada (de l'anglès *Comparative Genomic Hybridization*)

CHOP: ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina i prednisona

CLTC: clatrina (de l'anglès *clathrin*)

CLL: leucèmia limfàtica crònica (de l'anglès *Chronic Lymphocytic Leukemia*)



DLBCL: limfoma difús de cèl·lula gran B (de l'anglès *Diffuse Large B-Cell Lymphoma*)

DLBCL-NOS: DLBCL no específic d'una altra categoria (de l'anglès *Not Otherwise Specified*)

DNA: àcid desoxiribonucleic (de l'anglès *Deoxyribonucleic acid*)



EBER-1 i **EBER-2**: gens que codifiquen per l'RNA del EBV

EBNA-1: antigen nuclear 1 del EBV

EBV: virus Epstein-Barr

EMA: antigen epitelial de membrana (de l'anglès *Epithelial Membrane Antigen*)



FGFR3: receptor del factor de creixement dels fibroblastes 3 (de l'anglès *Fibroblast Growth Factor Receptor 3*)

FL: limfoma fol·licular (de l'anglès *Follicular Lymphoma*)



GCB-DLBCL: DLBCL amb un perfil d'expressió gènica de centre germinal (de l'anglès *Germinal Center B-cell like DLBCL*)



HAART: teràpia antiretroviral altament activa (de l'anglès *Highly Active Antiretroviral Therapy*)

HHV8: Herpes virus 8 humà (de l'anglès *Human Herpes Virus 8*)



ID3: inhibidor d'unió al DNA 3 (de l'anglès *Inhibitor of DNA binding 3*)

IG: Immunoglobulina

IGH: cadena pesada de les immunoglobulines (de l'anglès *Immunoglobulin Heavy chain*)

IGK: cadena lleugera (kappa) de les immunoglobulines

IGL: cadena lleugera (lambda) de les immunoglobulines

IPI: Index de Pronòstic Internacional

IRF4/MUM1: factor regulador de l'interferó 4 (de l'anglès *Interferon Regulatory Factor 4*)

IRF8: factor regulador de l'interferó 8 (de l'anglès *Interferon Regulatory Factor 8*)



Ki-67: antigen relacionat amb la proliferació



LMP1: proteïna latent de membrana de l'EBV (de l'anglès *Latent Membrane Protein 1*)



MAF: homòleg de l'oncogen aviari musculoaponeuròtic del fibrosarcoma (de l'anglès *MusculoAponeurotic Fibrosarcoma*)

MALT: teixit limfoide associat a mucosa (de l'anglès *Mucosa-Associated Lymphoid Tissue*)

MAX: factor X associat a MYC (de l'anglès *MYC Associated factor X*)

MM: mieloma de cèl·lules plasmàtiques (de l'anglès *Multiple Myeloma*)

MTA3: proteïna 3 associada a la metastasi (de l'anglès *Metastasis-associated 1 family member 3*)

MYC: gen homòleg de l'oncogen viral de la mielocitomatosis aviar (de l'anglès *v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)*)



NF-κB1: factor nuclear potenciador de les cadenes lleugeres kappa de les cèl·lules B activades (de l'anglès *Nuclear Factor of Kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1*)

NPM1: gen de la nucleofosmina (de l'anglès *NucleoPhosMin 1*)



OCAB: factor de transcripció 1 associat a POU2 (de l'anglès *POU class 2 associating factor 1*)

OCT2: factor de transcripció POU2 (de l'anglès *POU class 2 homebox 2*)

OMS: Organització Mundial de la Salut.



p21: gen inhibidor de la ciclina depenent de quinasa 1 (o també *CDKN1A*) (de l'anglès *cyclin-dependent kinase inhibitor 1A*)

p27: gen de la subunitat reguladora del proteosoma 26S (de l'anglès *26S proteasome regulatory subunit*)

PAX5: factor de transcripció PAX5 (de l'anglès *PAired BoX 5*)

PBL: limfoma plasmablastic (de l'anglès *Plasmablastic Lymphoma*)

PEL: limfoma primari de cavitats (de l'anglès *Primary Effusion Lymphoma*)

PET: tomografia per emissions de positrons (de l'anglès *Positron Emission Tomography*)

PCR: reacció en cadena de la polimerasa (de l'anglès, *Polymerase Chain Reaction*)

PI3K: fosfatidilinositol 3 quinasa (de l'anglès *Phosphatidylinositol 3 Kinase*)



RAG1 i RAG2: gen de la recombinació 1 i 2 (de l'anglès *Recombination Activating Gene*)

R-CHOP: Rituximab i CHOP

RNA: àcid desoxiribonucleic (de l'anglès *RiboNucleic Acid*)



SEC31A: proteïna de transport homòloga a SEC31p de llevat

SIDA: Síndrome d'Immunodeficiència Humana Adquirida

SKY: tècnica d'anàlisi espectral en colors del cariotip (de l'anglès *Spectral Karyotyping*)

SNC: Sistema Nerviós Central

SPIB1: factor de transcripció Spi-1 (de l'anglès *SPI-B transcription factor*)



TCR: receptor de les cèl·lules T (de l'anglès *T-Cell Receptor*)

TCF3: factor de transcripció 3 (de l'anglès *TransCiptor Factor 3*)

TdT: desoxinucleotidiltransferasa

TP53: gen supressor de tumor p53 (de l'anglès *Tumor protein P53*)



VIH: virus d'immunodeficiència humana



XBP1: proteïna 1 d'unió a la X-box (de l'anglès *X-box Binding Protein 1*)

Introducció

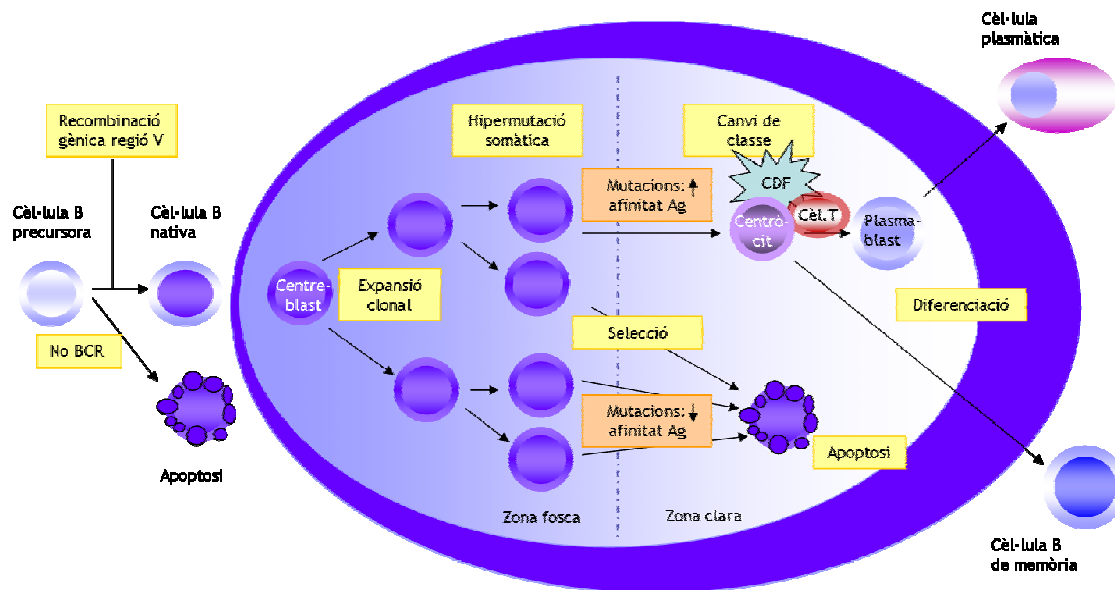
1.- Desenvolupament de la cèl·lula B i limfomàgènesi

Els teixits limfoides es divideixen en dos grups principals: els teixits limfoides primaris o centrals, i els teixits limfoides secundaris o perifèrics. Els teixits limfoides centrals són el moll d'os i el timus. Contenen les cèl·lules limfoides precursors i és on es dona lloc el procés de diferenciació antígen-independent de cèl·lula immadura a cèl·lula madura. Els òrgans limfoides perifèrics són els ganglis limfàtics, les amígdals, la melsa, i els teixits limfoides associats a mucoses (MALT), i en ells les cèl·lules limfoides madures es troben amb l'antigen (Ag) i desenvolupen diferents tipus de respostes immunològiques (Jaffe ES et al., 2011).

En el moll d'os es produeix el desenvolupament de la cèl·lula B, a través de la recombinació dels segments V, D i J de la cadena pesada dels gens de les immunoglobulines (*IGH*) i de l'assemblatge amb els gens de la cadena lleugera (*IGK*, *IGL*). En aquest procés, dos enzims codificats per gens activadors de la recombinació (*RAG1* i *RAG2*) produeixen trencaments en la doble cadena del DNA, que es resolen a través de processos d'auto-reparació. Tot i així, alguns d'aquests trencaments no reparats poden contribuir a les translocacions cromosòmiques característiques d'alguns limfomes (Lenz G et al., 2010).

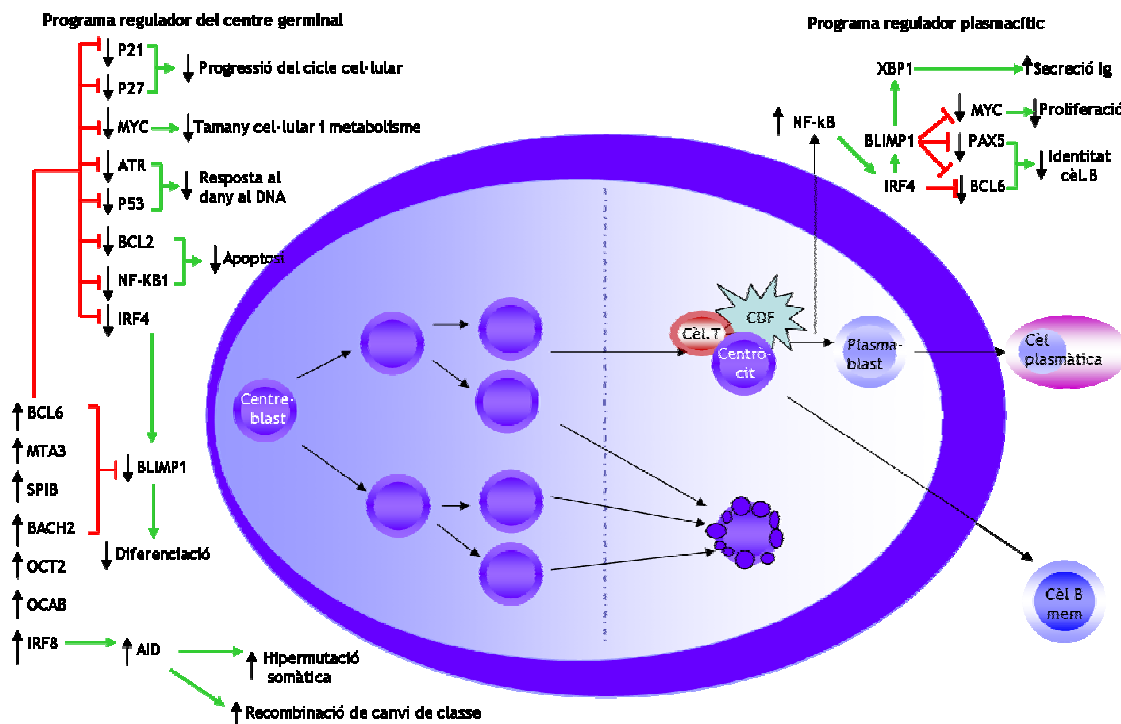
Els ganglis limfàtics estan constituïts per centres germinals que són la font d'origen de molts tipus de limfomes. El centre germinal es polaritza en dues zones: la zona fosca on es troben les cèl·lules B (els centreblastes) que s'estan dividint ràpidament, i la zona clara on les cèl·lules B (centròcits) s'estan seleccionant positivament per a la interacció amb l'antigen presentat per cèl·lules fol·liculars dendrítiques (CFD) i per a la interacció amb les cèl·lules T antigèn-específiques. Aquestes cèl·lules T específiques d'antigen i les cèl·lules fol·liculars dendrítiques contenen l'antigen en les rodalies dels centres germinals. La reacció del centre germinal comença quan l'antigen, juntament amb les senyals provinents de les cèl·lules T, activen les cèl·lules B (veure figura 1) (Lenz G et al., 2010).

Durant la reacció del centre germinal, es produeixen dos tipus diferents de modificacions del DNA que alteren el receptor de la cèl·lula B: la hipermutació somàtica i la recombinació de canvi de classe, i ambdues necessiten l'activació induïda per l'enzim citidina desaminasa (AID). La recombinació de canvi de classe implica el canvi de tipus de cadena pesada de les immunoglobulines, de IgM a IgG, IgA o IgE, mentre que la hipermutació somàtica implica l'aparició de mutacions de la regió variable de les immunoglobulines. Aquestes comporten la formació d'una població de cèl·lules B amb augment (o disminució) de l'afinitat per a un antígen determinat. Aquestes modificacions genètiques són necessàries per a la resposta immune normal, però també poden ser la causa del dany al DNA que originaria la patologia en els limfomes (Lenz G et al., 2010).

Figura 1. Passos del procés de diferenciació de la cèl·lula B. Adaptació de Klein U et al., 2008.

Des d'un punt de vista fenotípic, els centreblastes es caracteritzen per expressar CD10 i el factor de transcripció BCL6, i també per expressar gens que codifiquen per molècules implicades en el cicle cel·lular, la modificació i reparació del DNA. En canvi presenten un nivell baix d'expressió de les IGs i els manca expressió de BCL2, la qual cosa els fa susceptibles a ells i a la seva progènie a la mort cel·lular programada o apoptosi. Periòdicament van entrant a la regió clara del centre germinal on la seva morfologia canvia a centròcits. Els centròcits, degut a les hipermutacions somàtiques i al canvi de classe de les IGs, augmenten la seva afinitat antigènica alhora que tornen a expressar BCL2, alliberant-se així de l'apoptosi. També expressen gens que codifiquen per a molècules activadores com IRF4. Aquest programa d'expressió probablement reflecteix la dependència d'aquestes cèl·lules per senyals extrínseques derivades de les interaccions amb antigens, CFD i cèl·lules T. En el procés de diferenciació de centròcit a cèl·lula B de memòria o a cèl·lula plasmàtica l'expressió de BCL6 es veu reprimida mentre que la de IRF4/MUM1 i BLIMP1 es veu augmentada. Aquests dos gens juguen un paper repressor sobre l'expressió de BCL6 (veure figura 2) (Klein U et al., 2008).

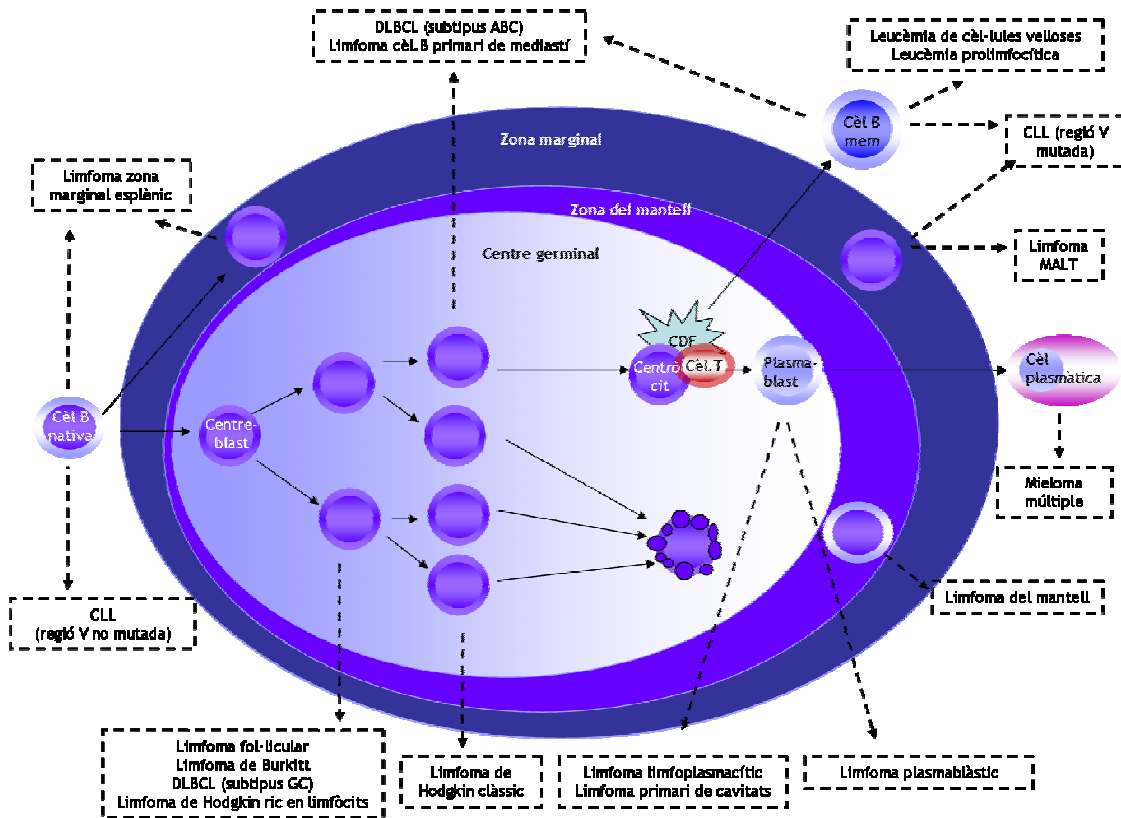
Figura 2. Diferenciació cel·lular en el centre germinal. Adaptació de Lenz G et al, 2010. Les línies vermelles indiquen que un factor regulador inhibeix un gen o una funció determinada, i les línies verdes indiquen una regulació positiva o activació.



Les neoplàsies de cèl·lules B tendeixen a mimetitzar els estadis de diferenciació normal de la cèl·lula B. Aquest mimetisme és utilitzat com a base per a la seva classificació i nomenclatura. Les cèl·lules B naïf, que encara no han tingut un encontre antigènic, sovint són CD5 positives, circulen per la sang perifèrica, constitueixen els fol·licles primaris i també ocupen les zones del mantell dels fol·licles secundaris. La major part de leucèmies limfàtiques cròniques i limfomes del mantell s'originen d'aquestes poblacions. Una gran part dels limfomes difusos de cèl·lula gran (DLBCLs) estan constituïts per cèl·lules que se semblen als centreblastes que han patit mutacions en les *IGs*, és a dir, se semblen a les cèl·lules que deriven d'aquelles que han estat exposades a la reacció del centre germinal. Les cèl·lules del limfoma de Burkitt (BL) expressen BCL6 i també tenen mutacions en els gens de les *IGs*, la qual cosa també les associa a cèl·lules exposades a la reacció del centre germinal. El DLBCL i BL són tumors molt proliferatius i tenen un comportament biològic agressiu. Els limfomes fol·liculars (FL) són tumors que estan constituïts per cèl·lules del centre germinal que deixen de patir l'apoptosi; en la major part dels casos aquest fet és degut a un reordenament cromosòmic, la *t(14;18)*, que dona lloc a la sobreexpressió de BCL2. Usualment, el FL està constituït per una població en la que predominen els centròcits sobre centreblastes, la qual cosa clínicament s'associa amb una menor agressivitat. Les cèl·lules B de memòria, que ja han sofert la reacció del centre germinal, circulen per la sang perifèrica però també poden ocupar les zones

marginals del fol·licles, la melsa i el teixit limfoide associat a mucosa. Els limfomes de zona marginal, ja sigui els associats a mucoses (limfomes MALT), els de la zona marginal esplènica o els primaris ganglionars estan constituïts per cèl·lules B que ja han passat pel centre germinal, cèl·lules B de memòria, i ocupen inicialment la zona marginal en aquestes neoplàsies. (veure figura 3) (Swerdlow SH et al., 2008).

Figura 3: Origen cel·lular dels limfomes B. Adaptació de Lenz G et al.,2010.



2.- Els limfomes B agressius

Els limfomes de cèl·lula B agressius són un grup divers de neoplàsies que s'originen en diferents estadis del desenvolupament i per varis mecanismes de transformació. L'última classificació de l'Organització Mundial de la Salut (OMS) reflecteix aquesta complexitat amb l'addició de noves entitats i variants (veure taula 1) (Swerdlow SH, et al. 2008).

Taula 1.

ELS LIMFOMES B AGRESSIUS SEGONS LA CLASSIFICACIÓ DE L' OMS
<ul style="list-style-type: none"> • DLBCL • Limfoma de cèl·lula gran B primari de mediastí (timus) • Limfoma de cèl·lula gran B intravascular • Limfoma de cèl·lula gran B ALK positiu (ALK+ LBCL) • Limfoma plasmablastic (PBL) • Limfoma primari de cavitats (PEL) • Limfoma de cèl·lula gran B herpes 8 positiu associat a la malaltia de Castelman • Limfoma de Burkitt (BL) • Limfoma de cèl·lula B, no classificable, amb característiques intermèdies entre DLBCL i BL (BCLU) • Limfoma de cèl·lula B, no classificable, amb característiques intermèdies entre DLBCL i limfoma de Hodgkin clàssic

En la present tesi en centrarem en l'estudi i descripció dels següents limfomes B agressius: limfoma B difus de cèl·lules grans (DLBCL), limfoma de Burkitt (BL), limfoma de cèl·lules B, no classificable, amb característiques intermèdies entre DLBCL i BL (BCLU), limfoma plasmablastic (PBL) i limfoma de cèl·lules grans B ALK+ (ALK+ LBCL).

2.1.- Limfoma difús de cèl·lula gran B

El DLBCL és una proliferació difusa de cèl·lules B neoplàsiques de mida mitjana a gran amb un nucli igual o més gran que el nucli d'un histiòcit, o el doble de la mida d'un limfòcit petit. Estudis morfològics, biològics i clínics han permès la subdivisió d'aquesta categoria en variants morfològiques, en subgrups moleculars i immunofenotípics i en diferents subtipus amb unes característiques clínico-patològiques específiques, tal i com reflecteix l'última classificació de l'OMS. Tot i així, hi ha encara un gran nombre de casos amb un criteri biològic heterogeni, per els quals no hi ha un criteri acceptat per a la subdivisió. Aquests casos són els que estan classificats com a DLBCL sense especificar (NOS) (veure taula 2) (Swerdlow SH, et al. 2008).

Taula 2.

VARIANTS I SUBTIPUS DEL DLBCL
<p>DLBCL, NOS</p> <ul style="list-style-type: none"> • Variants morfològiques més comunes <ul style="list-style-type: none"> Centreblastica Immunoblastica Anaplàsica • Variants morfològiques rares • Subgrups moleculars <ul style="list-style-type: none"> Cèl·lula B de centre germinal (GCB) Cèl·lula B de perfil activat (ABC) • Subgrups immunohistoquímics <ul style="list-style-type: none"> DLBCL CD5-positius <ul style="list-style-type: none"> Cèl·lula B de centre germinal (GCB) Cèl·lula B de no centre germinal (non-GCB) <p>Subtipus de DLBCL</p> <ul style="list-style-type: none"> • Limfoma de cèl·lula gran B ric en cèl·lules T/ histiòcits • DLBCL primari del sistema nerviós central • DLBCL primari cutani, de tipus cama • DLBCL EBV positiu de la vellesa

El DLBCL NOS representa el 31% dels limfomes no-Hodgkin, i és el tipus de limfoma agressiu més freqüent en adults. L'edat mitja d'aquests pacients és de 64 anys, tot i que pot afectar a pacients de qualssevol edat. Existeix un lleuger predomini masculí, rati masculí:femení 1.2:1 (Armitage JO et al., 1998).

La majoria de pacients amb DLBCL no estan sota factors de risc coneguts. Una minoria de casos es presenten en pacients amb una immunodeficiència congènita o adquirida, com és el cas de la infecció per VIH, transplantament, tractament amb metotrexat en pacients amb artritis reumatoide, i tractament amb fluradabina en pacients amb un limfoma B de baix grau. Aquests casos sovint estant associats al virus Epstein-Barr (EBV). Els casos de DLBCL Epstein-Barr positius de la gent gran, els quals es presenten en pacients sense una

immunodeficiència manifesta, es creu que són resultat d'un deteriorament immunològic que succeeix com a part d'un procés associat a l'edat (Jaffe ES et al., 2011).

Els pacients amb DLBCL presenten un creixement ràpid dels ganglis limfàtics o de masses tumorals en regions extranodals. Aproximadament un 40% dels casos debuten en regions extraganglionars, i un 71% tenen una implicació extranodal al llarg de la malaltia (Harris NL et al., 1994). Les regions extranodals més freqüentment afectades inclouen el tracte gastrointestinal (especialment l'estómac o regió ileocecal), el sistema nerviós central, testicle, teixits tous, melsa, os, glàndules salivals, ronyó, pulmó i fetge. Els limfomes extranodals específics d'algunes regions com la pell i el sistema nerviós central mostren unes característiques clíniques i biològiques diferents i, de fet, la localització primària dels DLBCLs es considera un tret important definitori del comportament d'aquests limfomes (Swerdlow SH et al, 2008).

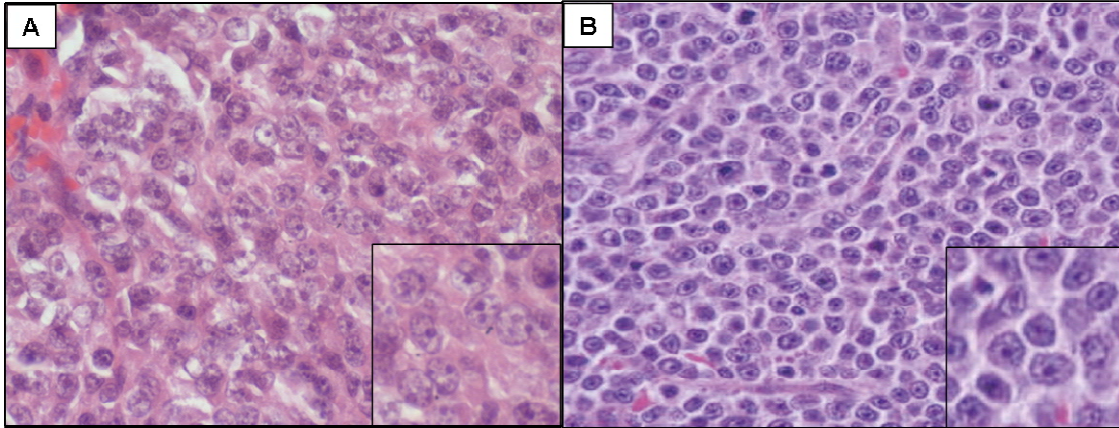
Aproximadament la meitat dels pacients presenta la malaltia en estadis primarencs (estadi I-II), i un terç sol presentar simptomatologia B. La implicació del moll d'os es dona al voltant d'un 10-30% dels casos i pot mostrar concordança morfològica (infiltració de cèl·lules de mida gran en una distribució nodular, intersticial o difusa) o presentar una morfologia discordant (presència d'un component de baix grau) que és el més freqüent (Armitage JO et al., 1998).

Histològicament, els ganglis i teixits limfàtics afectats pel DLBCL mostren una arquitectura total o parcialment esborrada per un infiltrat difús de les cèl·lules del limfoma, sovint acompanyada per necrosi i infiltració dels teixits veïns. D'una manera menys comuna, el limfoma pot mostrar un patró interfol·licular o sinusoïdal en els ganglis afectats. En rares ocasions, les cèl·lules tumorals poden créixer de manera molt cohesiva, imitant els carcinomes. També es pot observar un patró de "cel estrellat" format pels histiòcits que fagociten restes cel·lulars i que es troben entre les cèl·lules tumorals. L'esclerosi també pot ser-hi present sobretot en tumors mediastínics i retroperitoneals. (Jaffe ES et al., 2011; Swerdlow SH et al, 2008).

Citològicament el DLBCL està format per cèl·lules limfoides de mida mitjana o gran amb característiques morfològiques dels centreblastes, immunoblastes, o cèl·lules amb característiques intermèdies. Els centreblastes tenen un nucli vesiculat rodó o ovalat que pot ser angulós o multilobulat. Els immunoblastes tenen un nucli rodó o ovalat amb un únic nuclèol gran i central i de vegades també poden presentar característiques plasmocitoides. La subclassificació citològica del DLBCL és opcional. Els limfomes amb més d'un 90% d'immunoblastes es solen considerar com la variant immunoblàstica, mentre que aquells que presenten menys d'un 90% reben el nom de variant centreblàstica (Engelhard M et al.,1997; Lennert K et al., 1992). Tot i així, pot ser difícil decidir si una cèl·lula del limfoma és un immunoblast o un centreblast, sobretot perquè la majoria contenen la meitat d'ambdós o perquè les cèl·lules presenten característiques intermèdies (veure figura 4) (Harris NL et al., 1994). La variant anaplàsica està formada per cèl·lules amb nucli pleomòrfic, sovint multinucleat i amb citoplasma abundant (Haralambieva E et al., 2000). Alguns casos de DLBCL poden presentar una maduració plasmacítica, on hi ha cèl·lules del limfoma barrejades amb cèl·lules plàsmatiques d'aspecte madur. També es poden trobar entre les cèl·lules neoplàsiques un

nombre variable de cèl·lules reactives, com limfòcits petits (la gran majoria limfòcits T), cèl·lules plasmàtiques i histiòcits.

Figura 4. Imatges en hematoxilina-eosina de dos casos de DLBCL, la imatge A es correspon a una morfologia centreblàstica i la B es correspon a una morfologia immunoblàstica.



El perfil immunofenotípic del DLBCL es caracteritza per l'expressió de marcadors de diferenciació de cèl·lula B, incloent PAX5, CD19, CD20, CD22, CD79a i CD79b. L'expressió de IGs de superfície i/o citoplasmàtiques es poden detectar en un 50-75% dels casos (Swerdlow SH et al, 2008). Els marcadors de cèl·lula T són negatius, tot i que CD5 és positiu en un 10% dels casos. Aquests DLBCL que mostren coexpressió de CD5 normalment representen DLBCLs *de novo*. Cal excloure, però, que no es tracti de progressions de limfomes de més baix grau, com la leucèmia limfàtica crònica, el limfoma de cèl·lules del mantell o, fins i tot, de limfomes de la zona marginal (Tagawa H et al., 2005). L'expressió de CD10 apareix entre un 20% a un 40% dels DLBCLs. Aproximadament el 60% dels casos són BCL6 positius i el 50% són BCL2 positius, sent més elevada aquesta freqüència en tumors nodals que en extranodals (Jaffe ES et al., 2011). Un menor grup de casos són positius per CD30 mostrant un patró heterogeni i de vegades associat a la variant anaplàsica (Piris M et al., 1990). Alguns casos poden expressar marcadors associats a la diferenciació plasmocel·lular, com CD138 o IRF4/MUM1 (Jaffe ES et al., 2011). La tinció per a Ki-67 mostra un elevat índex proliferatiu: més gran del 20% però menor del 80%, tot i que hi ha alguns casos que poden tenir índex proliferatiu del 100% (Miller TP et al., 1994).

El DLBCL presenta reordenament dels gens que codifiquen per a les cadenes pesades i lleugeres de les immunoglobulines (*IGH*, *IGK* i *IGL*). El gen que codifica per a la regió variable de la cadena pesada de les immunoglobulines està hipermutat, i en alguns casos pot patir mutacions somàtiques (Jaffe ES et al., 2011). La patogènesi del DLBCL és complexa ja que aquest és un grup heterogeni de tumors. La majoria de casos de DLBCL són casos que apareixen *de novo*, però n'hi ha d'altres que poden ser el resultat d'una transformació d'un limfoma B de baix grau. Per a la transformació a DLBCL es requereixen alteracions genètiques addicionals, com la mutació de *TP53*, tot i que els mecanismes específics implicats en la progressió de cada limfoma de baix grau no estan ben definits (Xu-Monette ZY et al., 2012). Pel

que fa a la patogènesi dels DLBCLs *de novo* s'han identificat alteracions genètiques de manera recurrent, com *BCL6* (3q27) i també en *BCL2* (18q21), però també s'estan detectant alteracions en altres gens però en una menor freqüència com *MYD88*, *CD79B*, *CARD11* i *TP53* entre d'altres (Pasqualucci L et al., 2011; Zhang J et al., 2013; Lohr JG et al.2012).

El reordenament de *BCL6* succeeix al voltant del 30% de casos de DLBCL i és l'alteració genètica més freqüentment descrita (Offit K et al., 1994; Ohno H et al., 1997). La parella més comuna de la translocació amb *BCL6* sol ser el gen de la cadena pesada de les immunoglobulines: t(3;14)(q27;q32). Les mutacions somàtiques de *BCL6* són un fet recurrent en els DLBCL (present en un 70% dels casos) però no està relacionada amb la presència del reordenament. L'expressió persistent de la proteïna BCL6 com a resultat del reordenament o mutació del gen inhibeix la diferenciació i l'apoptosi, donant lloc a proliferació cel·lular (Migliazza A et al., 1995).

Aproximadament el 20% dels casos mostren reordenament de *BCL2* degut a la t(14;18) (q32;q21), translocació característica del limfoma fol·licular (Weiss LM et al., 1987; Hill ME et al., 1996; Huang JZ et al., 2002; Tsujimoto Y et al., 1985). L'expressió proteica de BCL2 està relacionada en part amb la presència del reordenament del gen (Gascoyne RD et al., 1997; Iqbal J et al., 2004; Kramer MH et al., 1998). Alguns casos poden transformar-se a DLBCL a partir d'un limfoma fol·licular conegut o ocult, o bé esdevenir DLBCL sense la presència d'una fase precursora de limfoma fol·licular. El mecanisme alternatiu de sobreexpressió proteica de BCL2 és l'amplificació. Aquesta s'associa a un dels subtipus moleculars de DLBCL (ABC-like DLBCL) (Iqbal J et al., 2006).

El desenvolupament de noves tècniques moleculars ha suposat un avenç molt important en l'estudi dels DLBCLs. Mitjançant estudis d'expressió gènica s'ha pogut diferenciar dos subgrups de DLBCL que corresponen a diferents estadis de diferenciació de la cèl·lula B. Un grup expressa els gens característics de la cèl·lula B del centre germinal (GCB-like DLBCL) i l'altre expressa els gens que normalment s'indueixen durant l'activació *in vitro* de les cèl·lules B de sang perifèrica (ABC-like DLBCL) (Dave SS et al., 2006; Hummel M et al., 2006). La dificultat d'utilitzar perfils d'expressió gènica en la pràctica diària diagnòstica va fer que sorgissin alternatives amb algorismes de marcadors immunohistoquímics, com la de Colomo basada en patrons de diferenciació (CD10, BCL6, MUM1 i CD138) (Colomo L et al., 2003) o la coneguda classificació de Hans (CD10, BCL6 i IRF4/MUM1) la qual va donar lloc a la subclassificació immunohistoquímica dels DLBCLs en DLBCL de centre germinal (GCB) i de no centre germinal ("non-GCB") (Hans CP et al., 2004). De totes formes, aquests intents de traslladar la informació dels perfils d'expressió gènica a perfils immunohistoquímics més simples no ha estat suficientment exitós com per poder reconèixer els diferents subgrups biològicament rellevants de DLBCL (Gutiérrez-García G et al.,2011).

L'aparició de noves tecnologies en el camp de la genètica ha permet un gran avanç en l'estudi de les neoplàsies. En aquest tipus de limfomes, els estudis d'"arrays" en hibridació genòmica comparada (aCGH) han mostrat guanys de manera recurrent dels cromosomes 1q, 2p, 3, 6p, 7q, 11q, 12q, 13p, 18q i 19q, i pèrdues als cromosomes 5q, 6q, 8p, i 9p (Robledo C, 2009; Tirado CA et al., 2012; Testoni M et al., 2011). Segons el perfil d'expressió gènica els

casos GCB DLBCL mostren guanys de 1q, 2p, 7q i 12q, mentre que els casos ABC es caracteritzen per guanys en 3q, 18q i 19q i pèrdues a 6q i 9p (Tirado CA et al., 2012). Altres tècniques de citogenètica molecular com l'SKY (anàlisi espectral del cariotip) han permès la troballa de noves translocacions com: t(3;14)(q21;q32), t(1;13)(p32;q14), t(1;7)(q21;q22) i t(6;8)(q11;q11) (Jaffe ES et al., 2011). L'associació de totes aquestes alteracions genètiques amb els diferents subgrups moleculars definits mitjançant els perfils d'expressió han permès consolidar la classificació molecular del DLBCL.

Encara que el DLBCL és un tumor agressiu i sense tractament comporta la mort en un o dos anys, és una malaltia potencialment curable. La corba de supervivència tendeix a estabilitzar-se després de tres anys, la qual cosa demostra una curació en una important proporció de pacients. Al llarg del temps el DLBCL ha estat tractat amb combinació de quimioteràpia, l'estàndard combinació de ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina i prednisona (CHOP) o variants, i radioteràpia en aquells casos amb masses tumorals de mida gran o localitzada. L'addició de Rituximab (R), un anticòs monoclonal quimèric que s'uneix específicament a CD20, al tractament amb CHOP (R-CHOP) ha augmentat significativament la supervivència global dels pacients amb aquesta malaltia (Sehn LH et al., 2005).

L'Índex de Pronòstic Internacional (IPI) és un model predictiu i un bon marcador de supervivència en els DLBCLs. Nivells elevats d'IPI estan associats amb una pitjor supervivència: la supervivència global als cinc anys en pacients d'alt risc és d'un 26%, comparat amb el 73% en pacients amb baix risc (sense llistat d'autors, 1993). Aquest índex s'ha revisat per a poder aportar una millor predicció de la supervivència en pacients tractats amb combinació de CHOP i Rituximab (Sehn LH et al., 2007). La limitació més important de l'IPI és la dificultat en identificar comportament dels tumors dels pacients classificats en els grups de risc intermig i més baix. Els perfils d'expressió gènica milloren aquesta capacitat classificadora de l'IPI. Tanmateix, per ells sols permeten identificar de manera molt robusta el comportament biològic dels tumors classificats com DLBCL- ABC i GCB (Lenz G et al., 2008)

Des del punt de vista genètic, la majoria d'estudis no mostren un significat pronòstic del reordenament de *BCL2* en el DLBCL. Alguns estudis mostren que aquest reordenament s'associa amb casos GCB DLBCL i que presenten un mal pronòstic en aquest subtipus (Huang JZ et al., 2002; Barrans SL et al., 2003). Pel que fa al reordenament de *BCL6* també hi ha resultats contradictoris. La presència d'aquest reordenament s'ha observat en una més elevada incidència en el subtipus "non-GCB" DLBCL, malgrat tot tampoc no s'han trobat resultats concloents respecte a la supervivència (De Paepe Pet al., 2005; Van Imhoff GW et al., 2006; Niitsu N et al., 2007; Barrans SL et al., 2002; Iqbal J et al., 2007; Jerkeman M et al., 2002). Tot i així, tots aquests estudis fan referència a l'era pre-rituximab. Estudis posteriors de pacients tractats amb Rituximab mostra que la presència de reordenaments de *BCL2* no té impacte a la supervivència (Copie-Bergman C et al., 2009; Iqbal J et al., 2011). La presència de mutacions de *TP53* en pacients tractats amb R-CHOP està correlacionada amb una menor supervivència global. Aquesta pitjor supervivència associada a la mutació de *TP53* també es manté tant en els casos ABC com GCB (Xu-Monette ZY et al., 2012). Pel que fa als estudis de perfils

d'expressió gènica, els pacients del grup GCB-DLBCL presenten una millor supervivència global en 5 anys (76% en front un 16%) (Alizadeh AA et al., 2000).

Varis estudis han demostrat que l'expressió proteica de p53, BCL2 i la negativitat per a CD10/BCL6 són indicadors de mal pronòstic. Molts estudis han demostrat que la positivitat per BCL2 i l'absència de marcadors de centre germinal són indicadors rellevants de mal pronòstic. L'expressió d'IRF4/MUM1 i el significat pronòstic de l'índex proliferatiu mesurat mitjançant la tinció de Ki-67 ha estat més controvertit (Miller TP et al., 1994; Colomo I et al., 2003; Zhang A et al., 1999). L'addició de Rituximab a CHOP aboleix els efectes adversos de l'expressió de BCL2 i l'impacte positiu de BCL6 a la supervivència clínica (Swerdlow SH et al, 2008).

Des de el punt de vista morfològic, alguns estudis han mostrat una pitjor supervivència en aquells casos amb morfologia immunoblàstica comparada amb els casos amb una morfologia centreblàstica, però aquesta relació no ha pogut ser demostrada per altres autors donada la baixa reproduïbilitat que ofereix la morfologia (Swerdlow SH et al, 2008; Ott G et al., 2010). Aquells casos de DLBCL amb una morfologia de moll d'os discordant presenta una millor supervivència que aquells casos de DLBCL amb la mateixa morfologia al moll d'os (Campbell J et al., 2006).

2.2.- Limfoma de Burkitt

El BL fou descrit per primer cop l'any 1958 per el cirurgià irlandès Denis P. Burkitt que treballava a Uganda com "un sarcoma que afecta a la mandíbula en nens africans" (Burkitt D, 1958). El BL ha tingut un paper important en l'enteniment de la tumorigènesi. Fou el primer tumor associat amb un virus, un dels primers tumors relacionats amb una translocació cromosòmica responsable de l'activació d'un oncogen i el primer limfoma associat amb la infecció del VIH. EL BL és un dels tumors humans de més ràpid creixement, les cèl·lules del tumor es dupliquen entre les 24 i 48h, i fou també el primer tumor infantil que responia exclusivament a la quimioteràpia (Molyneux EM et al., 2012).

El BL està definit per l'OMS com una neoplàsia limfoide altament agressiva, de presentació sovint extranodal o en forma de leucèmia aguda, formada per cèl·lules B monomòrfiques de mida mitjana amb citoplasma basòfil i amb un elevat rati mitòtic. La característica genètica que el defineix és la presència del reordenament de l'oncogen *MYC*. Immunofenotípicament, les cèl·lules tumorals expressen CD19, CD20, CD22 i CD79a. També expressen IgM amb restricció de cadena lleugera i són positives tant per CD10 com per BCL6. Aquest immunofenotip ajuda a definir el BL com un limfoma de centre germinal. Les cèl·lules del BL són negatives per a CD5, CD23, ciclina D1 i TdT. BCL2 és negatiu encara que en alguns casos també es pot expressar. Al voltant d'un 100% de les cèl·lules són positives per Ki-67 (Swerdlow SH et al, 2008).

Existeixen tres variants clíniques del BL que són:

- a) BL endèmic: aquest BL és endèmic d'Àfrica equatorial, d'aquelles regions on la malària és endèmica. Afecta sobretot a nens d'edats compreses entre els 4 i els 10 anys i amb predomini masculí (rati masculí: femení, 2:1) (Burkitt D, 1958). Els tumors solen tenir una presentació extranodal, afectant sobretot la mandíbula, ossos facials i òrbita ocular. La mandíbula i estructures facials estan implicades en aproximadament el 70% dels casos de nens més petits de 5 anys però només en el 25% dels casos de nens de més de 14. L'afectació facial pel limfoma pot ocupar els sinus o bé causar la pèrdua de les dents. Les alteracions orbitals són freqüents i poden afectar a nervis cranials. Altres llocs d'afectació són la regió més distal de l'ili, cec, ovari, ronyó i mama. La majoria d'aquests casos endèmics són EBV positius (Jaffe ES et al., 2011).
- b) BL esporàdic: aquesta variant es pot trobar en qualssevol part del món, afectant sobretot a nens o adults joves; suposa entre un 30% i un 50% dels limfomes pediàtrics. No és freqüent en adults, representant entre l'1% o 2% dels limfomes de l'Europa occidental i Nord Amèrica (Harris NL et al., 1994). La mitjana d'edat dels pacients és d'uns 30 anys, amb un predomini masculí de 2:1 o 3:1 (Boerma EG et al., 2004). L'afectació del tracte gastrointestinal és comuna en el BL esporàdic, mentre que la presentació de la mandíbula o de l'òrbita ocular no és freqüent. Entre el 80% i el 90%

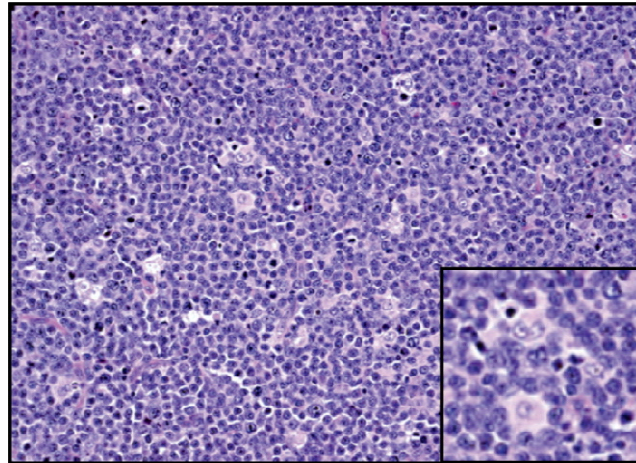
dels casos presenten una afectació d'estructures intrabdominals. La regió més comuna de presentació sol ser la ileocecal però també es pot detectar a l'apèndix, al colon ascendent i al peritoneu. Els òrgans extra-abdominals de presentació solen ser l'ovari, el ronyó i la mama. L'aparició bilateral a les mames sol estar associada amb el començament de la pubertat, l'embaràs o bé amb la lactància. L'afectació de moll d'os és freqüent i la podem trobar sobretot en aquells casos de progressió de la malaltia. Tot i que la presentació del BL en el sistema nerviós central (SNC) no és freqüent en el moment del diagnòstic, es pot presentar, excepte que es doni una quimioteràpia efectiva pel SNC juntament amb la que es doni a nivell sistèmic. L'afectació ganglionar s'observa només entre un 10% i un 15% dels casos i es detecta més en adults que en nens. Els pacients en un estadi avançat de la malaltia o amb una massa "bulky" poden presentar cèl·lules neoplàsiques en una extensió de sang perifèrica. La presència del EBV està descrita al voltant d'un 30% dels casos, però aquest percentatge és encara més baix en països occidentals (Jaffe ES et al., 2011).

- c) BL associat a immunodeficiència: aquesta variant de BL es va descriure primerament en aquells casos associats amb la infecció pel VIH, representant entre el 30% o 40% dels limfomes relacionats amb el virus. La infecció per VIH s'observa entre un 25% i un 40% de tots els casos. Molts d'aquests casos poden presentar unes característiques morfològiques lleugerament atípiques que sovint estan acompanyades de diferenciació plasmocitoide. Aproximadament un terç dels limfomes associats al VIH són BL. Els factors que predisposen al desenvolupament d'un BL associat a immunodeficiència inclouen un recompte de cèl·lules CD4 menor que $0.2 \times 10^9/L$; llarg estadiatge de la infecció per VIH, sobretot en aquells pacients que no han rebut una teràpia antiretroviral altament activa (HAART); i en pacients molt joves (entre 10 i 19 anys). Aquesta variant de BL es sol presentar en estadis molt avançats en el moment del diagnòstic, amb presència de símptomes B i en un estatus de la malaltia molt pobre, en aproximadament el 70% dels casos. La presentació extranodal és freqüent, normalment afectant el tracte gastrointestinal, el moll d'os o el SNC. Els factors pronòstics adversos més importants inclouen: un baix recompte de cèl·lules CD4, presència de la SIDA abans del desenvolupament del BL, estatus pobre de la malaltia i en estadi IV, com també l'afectació del SNC o infiltració al moll d'os (Raphael M et al., 1991; Jaffe ES et al., 2011).

Tots els casos de BL endèmic, la majoria de casos de BL esporàdic i molts casos de BL associat a immunodeficiència comparteixen les mateixes característiques morfològiques descrites com a tipus clàssic. L'arquitectura és clarament difusa, amb evident patró de "cel estrellat" detectable a baix augment (veure figura 5). Les cèl·lules són de mida mitjana amb un nucli d'aparença monòtona i uniforme. El nucli sol presentar de dos a cinc nuclèols petits i agrupats. El citoplasma d'aquestes cèl·lules en molts casos poden contenir vacuoles lipídiques,

detectables en extensions de moll d'òs o improntes de gangli limfàtic (Swerdlow SH et al, 2008).

Figura 5. Imatge en hematoxilina-eosina d'un limfoma de Burkitt. La imatge inferior dreta és un detall augmentat dels nombrosos macròfags que donen l'aspecte característic de "cel estrellat".



La causa del BL és desconeguda. Com a possibles factors causals s'han suggerit l'estimulació antigènica crònica pel virus de l'Epstein-Barr, la immunosupressió associada a la infecció persistent de la malària i també la infecció pel VIH.

La infecció pel EBV representa el segon factor més freqüent en la patogènesi del BL. L'EBV és un herpesvirus humà que tant és capaç de transformar les cèl·lules B com de mantenir-les en un estadi de latència. L'estadi de latència de l'EBV està caracteritzat per tres patrons d'expressió gènica diferents. El patró de latència característic del BL és el de tipus I, on els gens virals que s'expressen són EBER-1, EBER-2 i EBNA-1. Aquest patró de latència està més associat al tipus endèmic de BL, tot i que no està present en tots els casos. Això suggereix que la infecció pel EBV no pot ser del tot crítica per a la patogènesi i que potser podrien estar implicats altres virus encara no identificats. La infecció per EBV també s'ha vist en menys d'un 30% de casos de BL esporàdics que presenten unes característiques morfològiques i immunofenotípiques molt similars a BL endèmics (Jaffe ES et al., 2011).

Estudis genètics recents en el BL han demostrat la presència de noves mutacions en alguns gens com *TCF3* i *ID3* que es descriuen en més profunditat en l'apartat 4 (L'oncogen *MYC* en el desenvolupament de la cèl·lula B i en la limfomagènesi).

2.3.- Limfoma de cèl·lules B, no classificable, amb característiques intermèdies entre limfoma difús de cèl·lula gran i limfoma de Burkitt (BCLU).

Els limfomes inclosos en la categoria provisional de la OMS definida com BCLU, són limfomes agressius que presenten característiques morfològiques i genètiques característiques del DLBCL i també del BL, però que per raons biològiques i clíniques no han de ser inclosos en aquestes dues entitats (Swerdlow SH et al, 2008). L'objectiu de la creació d'aquesta categoria en l'última edició de l'OMS va ser la de generar coneixement i intentar definir millor el subgrup de limfomes usualment classificats com "limfomes de Burkitt-like", que de manera clàssica han suposat una "zona gris" entre BL i DLBCL. Aquests tumors han tingut un comportament biològic molt agressiu i han estat típicament refractaris als tractaments convencionals.

Els casos inclosos en aquesta nova categoria tenen característiques morfològiques intermèdies entre DLBCL i BL, amb tumors constituïts per algunes cèl·lules que són més petites que les típiques del DLBCL, semblants a les del BL, o per tumors constituïts per cèl·lules més grans que les del BL, semblants a les del DLBCL, que també presenten un elevat índex proliferatiu, un patró de creixement en "cel estrellat", i un immunofenotip concordant amb el del BL. Alguns casos poden ser morfològicament més típics de BL però tenen un immunofenotip o característiques genètiques que l'exclouen d'aquest diagnòstic. Alguns limfomes fol·liculars transformats es poden incloure en aquesta nova categoria. Aquesta categoria és heterogènia i no es considera una entitat diferent, però és útil per a la classificació de casos que no tenen uns criteris de DLBCL o de BL clàssic. En la pràctica diària, la utilització d'aquesta categoria diagnòstica no ha estat fàcil.

Aquests limfomes són relativament infreqüents i es solen presentar en adults. En més de la meitat d'aquests pacients la malaltia es presenta de manera generalitzada i sovint amb una afectació extraganglionar. A diferència del BL, en aquesta nova categoria no hi ha una localització preferencial a la regió ileocecal o oral. El moll d'os i la sang perifèrica també es poden veure implicats. Els pacients debuten amb limfadenopaties i masses tumorals en regions extranodals, i d'altres poden tenir una presentació leucèmica (Swerdlow SH et al, 2008).

Morfològicament estan típicament formats per a una proliferació difusa de cèl·lules transformades de mida mitjana a gran amb limfòcits petits barrejats i sense reacció estromal de fibrosis. És típica la presència de macròfags constituint un patró de creixement en "cel estrellat", com també l'alt nombre de figures mitòtiques i apoptosis prominents que li confereixen al tumor una aparença de BL. La morfologia cel·lular és variable. En alguns casos les cèl·lules són similars a les del BL, però amb més varietat en la mida i contorn del nucli; alguns casos són concordants amb el BL però tenen un immunofenotip i/o característiques genètiques atípiques; altres casos tenen un immunofenotip que és concordant amb el BL però que tenen una mida nuclear variable que és intermèdia entre el BL i el DLBCL, sovint també amb un contorn nuclear irregular (veure taula 3). En alguns casos però, d'una manera més ocasional, el nucli pot ser relativament petit i finament granular, semblant als nuclis del limfoma

limfoblàstic. Algun d'aquests últims casos han estat classificats com a "blàstics". És necessària la tinció per a TdT per excloure aquests últims casos dels casos de limfoma limfoblàstic. Cal remarcar, que els DLBCLs amb una morfologia més convencional i elevat índex proliferatiu no han de classificar-se dins aquesta categoria (Swerdlow SH et al, 2008).

La definició genètica d'aquests tumors tampoc és precisa. Entre un 35 i 50% de casos tenen reordenaments del gen *MYC*, en molts casos no associat a reordenaments *IGs* sino a altres gens no definits. Al voltant d'un 15% dels casos amb *MYC* reordenat poden presentar reordenaments addicionals dels gens *BCL2* i/o *BCL6* reordenat. Aquests casos s'anomenen "double/triple-hits". El diagnòstic d'aquesta nova categoria no s'hauria de fer en aquells casos on la morfologia és típica de DLBCL i existeix un reordenament de *MYC*; tampoc en els casos típics de BL en el quals no s'ha pogut demostrar el reordenament de *MYC*. De manera contrària, l'OMS suggereix que sí que hi haurien d'estar inclosos els DLBCLs que presenten el reordenament de *MYC* amb un gen de les immunoglobulines com a única anomalia genètica (com és característic en el BL) però que presenten una morfologia atípica. Els estudis citogenètics en casos de limfomes amb "dobles i triples-hit" han mostrat cariotips complexes, de manera similar als tumors amb reordenaments de *MYC* amb gens diferents de les *IGs*. (Swerdlow SH et al, 2008). Els estudis d'expressió gènica han mostrat que alguns casos amb "double-hit" tenen un perfil intermedi entre el BL i el DLBCL, o més similar al BL (Dave SS et al., 2006; Hummel M et al., 2006).

Fenotípicament, aquests limfomes es caracteritzen per presentar expressió de marcadors de línia B com CD19, CD20, CD22 i CD79a i també immunoglobulines, però els casos que reben el nom de "double-hit" poden no tenir expressió per a les *IGs*. En general, els casos que entrarien en aquesta nova categoria són els que presenten un immunofenotip suggestiu de BL (CD10+, BCL6+, BCL2- i IRF4/MUM1- o dèbilment positiu). Els casos que morfològicament s'assemblen al BL poden ser col·locats ens aquesta categoria quan BCL2 és moderat o altament positiu. L'índex proliferatiu mostrat per Ki-67 és normalment elevat, la qual cosa augmenta el diagnòstic diferencial de BL, però que en els casos publicats pot variar entre un 50% i un 100% (veure taula 3)(Swerdlow SH et al, 2008). Aquests limfomes són agressius i les estratègies terapèutiques no estan del tot establertes.

Taula 3. Característiques morfològiques i immunofenotípes principals del BL, DLBCL i d'aquesta nova categoria provisional.

	BL	BCLU	DLBCL
Morfologia cel·lular			
Tamany cel·lular	Només cèl·lules de mida petita o mitjana	Barreja de cèl·lules de mida petita, mitjana/gran	Freqüent la presència de cèl·lules de mida gran
"Cel estrellat"	Normalment present	Pot esser present	Normalment absent
Citologia	Monomòrfica	Mínimament pleomòrfica	Variable
Forma i mida del nucli	Rodona, oval i Intermedía	Algunes irregulars de mida Intermedía/gran	Predomini centreblàstic gran
Nuclèol	Múltiple, de 2 a 5, basòfil	Pot ser únic, central i prominent	Variable
Citoplasma	Basòfil i sovint vacuolat	Basòfil, possible absència de vacuoles	Basòfil i absència de vacuoles
Immunohistoquímica			
Proliferació (Ki-67)	>90% i homogènia	Al voltant d'un 90%, pot ser homo o heterogènia	Normalment <90% o heterogènia
Expressió de CD10	Positiva	Positiva	Variable; defineix el subtipus GCB
Expressió de BCL2	Negativa	Variable; els casos amb doble hit solen ser positius	60-70% positius
Expressió de BCL6	Positiva	Positiva	Majoria de casos
EBV-EBER	Positiu (segons la variant)	Negatiu	Normalment negatiu

Els limfomes amb "double-hit" sovint tenen implicació del moll d'os, de la sang perifèrica i del sistema nerviós central; i la gran majoria són resistents a les teràpies actuals, les quals semblen ser independents de la complexitat de les altres anomalies citogenètiques i tenen un mal pronòstic (Tomita N et al., 2009; Snuderl M et al., 2010; Johnson NA et al., 2009). A més la seva incidència s'ha relacionat amb un augment de l'edat, més del 30% dels pacients presenten "double o triple-hits" en edats avançades (Swerdlow SH et al, 2008).

2.4.- Limfoma plasmablàstic.

El limfoma plasmablàstic (PBL) és un DLBCL amb característiques immunofenotípiques similars als plasmablastes. En aquesta entitat no estan inclosos aquells DLBCLs amb morfologia plasmablàstica però amb fenotip de DLBCL madur (expressant CD20 i CD79a), els limfomes de cèl·lula gran B ALK positius, ni els limfomes limfoproliferatius herpes virus 8 (HHV-8) positius (Jaffe ES et al., 2011).

El PBL fou descrit per primer cop per Delecluse i col·laboradors com un limfoma agressiu de cèl·lula B present a la cavitat oral en el context d'una infecció pel VIH (Delecluse HJ et al., 1997).

El PBL és rar i sol aparèixer en el context d'una immunodeficiència, sobretot en pacients VIH positius, però també en aquells pacients amb immunosupressió iatrogènica com a conseqüència d'un trasplantament d'òrgans i en pacients amb malalties autoimmunes. El limfoma plasmablàstic és un tumor principalment d'aparició extraganglionar i té predilecció per a la cavitat oral, però també poden estar implicats altres regions, com la cavitat nasal, el tracte gastrointestinal (incloent l'anus), la pell, l'os, teixits tous i el pulmó. L'afectació ganglionar no és freqüent i no sol estar associada a la infecció pel VIH (Colomo L et al., 2004)

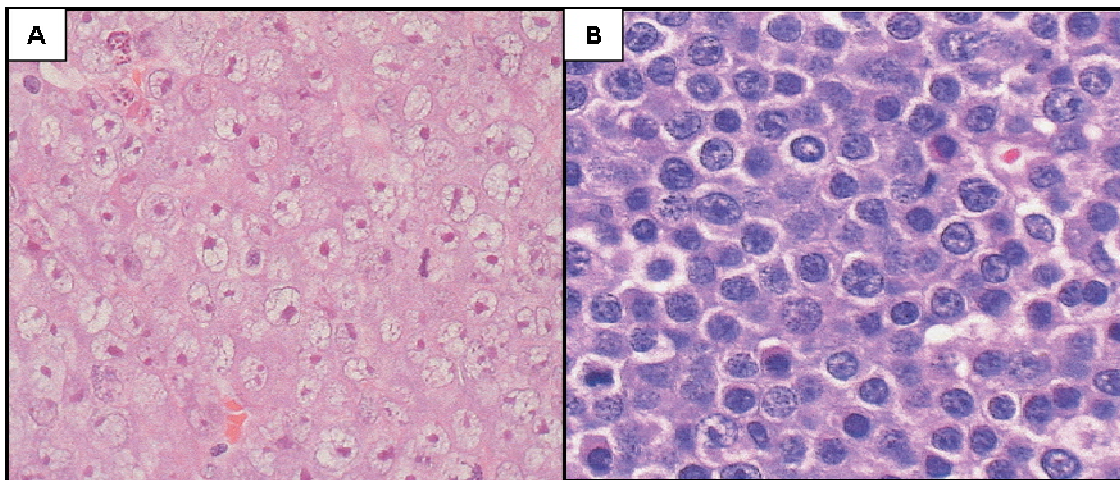
Hi ha una notable predominança masculina, on la majoria de pacients es troben entre la quarta i la cinquena dècada de la vida. S'han descrit pocs casos en nens amb immunodeficiència. La presentació de la malaltia és en estadis avançats (III o IV) en la majoria de pacients. L'IPI és de risc mig o elevat. El PET pot mostrar implicació òssia disseminada. Els tumors amb característiques de limfoma plasmablàstic poden presentar-se en pacients amb una història prèvia de neoplàsia de cèl·lula plasmàtica, incloent el mieloma de cèl·lula plasmàtica, o d'altres neoplàsies de baix grau (Martínez D et al., 2013). Aquests casos s'haurien de considerar transformacions plasmablàstiques de mieloma o d'altres limfomes de baix grau i distingir-los del limfoma plasmablàstic primari (Jaffe ES et al., 2011).

El curs clínic de la malaltia és molt agressiu, i més de tres quartes parts dels pacients moren a causa de la malaltia i tenen una supervivència mitja de sis o set mesos. Tot i aquest comportament tant agressiu, la supervivència global dels pacients ha augmentat recentment a causa dels nous tractaments del VIH.

Histològicament, el limfoma plasmablàstic es caracteritza per un infiltrat difús de cèl·lules cohesives amb un patró similar als casos amb mieloma de cèl·lula plasmàtica. Les cèl·lules solen presentar un únic nucli excèntric, nuclèol prominent o perifèric múltiple, amb un abundant citoplasma basòfil. Pot presentar un patró de creixement força cohesiu i és un limfoma que pot donar lloc a un diagnòstic de carcinoma. També es poden veure cèl·lules plasmàtiques madures barrejades. Hi ha una alta activitat mitòtica i les figures apoptòtiques són nombroses. Es poden reconèixer dos subtipus morfològics diferents: els casos amb un citologia monomorfa, blàstics purs, i els casos que es caracteritzen per una diferenciació plasmacítica, en els que es barregen cèl·lules tumorals amb major diferenciació plasmacítica (veure figura 6). Aquests aspectes morfològics tenen interès donat que els casos amb una citologia monomorfa són més freqüents en pacients VIH positius i són casos amb afectació de la cavitat oral, nasal i

àrea paranasal (tipus mucosa oral). Contràriament, els casos amb una diferenciació plasmacítica tendeixen a presentar-se en altres regions extranodals i en els ganglis limfàtics i poden associar-se a la presència de mieloma/plasmacitoma sincrònic o metacrònic. La presència d'un elevat índex proliferatiu, la localització extranodal, un context d'immunodeficiència i la presència del virus Epstein-Barr són marcadors útils per a fer un diagnòstic de limfoma plasmablàstic (Colomo L et al., 2004).

Figura 6. Imatges de dos casos de PBL. La imatge A es correspon a un cas amb morfologia monomorfa i la imatge B es correspon a un cas de PBL amb diferenciació plasmacítica.



L'immunofenotip és similar al de les cèl·lules plasmàtiques, i usualment s'observa negativitat o expressió dèbil de CD45, CD20, i PAX5. CD79a pot expressar-se de manera variable en un 50% a 85% dels casos. El tumor expressa marcadors associats a la diferenciació plasmocel·lular, com CD38, CD138, IRF4/MUM1, XBP-1, BLIMP1. Les immunoglobulines citoplasmàtiques s'expressen entre un 50% i un 70% dels casos, la majoria de les quals són IgG i la cadena lleugera és kappa o lambda. CD56 és normalment negatiu a la mucosa oral, però també es poden observar en els casos amb diferenciació plasmacítica, en particular associats a neoplàsia de cèl·lules plasmàtiques. L'expressió d'EMA i de CD30 també és freqüent. El limfoma plasmablàstic està associat amb un elevat índex proliferatiu (Ki-67>90%). L'expressió de BCL6 és bàsicament negativa o focalment positiva. El reordenament de les immunoglobulines és clonal. La hibridació in situ pel virus Epstein-Barr és positiva en el 75% dels casos i el patró de latència d'infecció per VEB en les cèl·lules tumorals és de tipus I. El rati de positivitat per EBV és pròxim al 100% en el tipus mucosa oral, associat amb la infecció de VIH. La presència de HHV-8 és absent (Colomo L et al., 2004; Jaffe ES et al., 2011).

Estudis amb aCGH han detectat que més del 40% dels casos presenten guanys d'alguna regió cromosòmica. Les regions cromosòmiques més freqüentment guanyades inclouen: 1p36, 1p34, 1q21-q23, 7q11, 11q i 22q. Les regions cromosòmiques que es perden en aquestes neoplàsies es presenten al voltant d'un 23% dels casos i són més heterogènies

(Chang C et al., 2009). El coneixement des de el punt de vista genètic d'aquests tumors és baix.

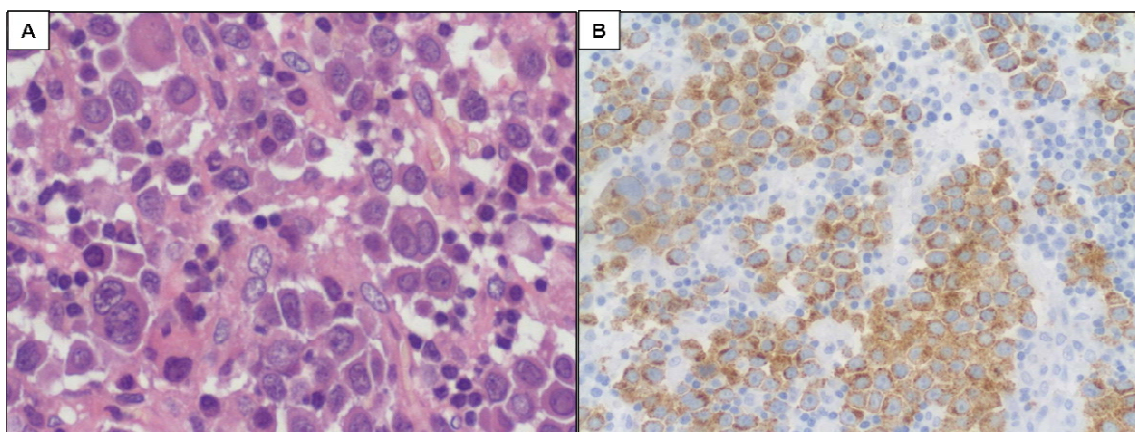
2.5.- Limfoma de cèl·lula gran B ALK positiu

El limfoma de cèl·lula gran B ALK positiu (ALK+ LBCL) és una variant agressiva del DLBCL amb expressió d'ALK que va ser descrita per primera vegada per Delsol i col·laboradors a l'any 1997. Les cèl·lules neoplàsiques d'aquest limfoma es caracteritzen per la seva semblança a cèl·lules transformades amb diferenciació terminal B i fenotip de cèl·lula plasmàtica (Delsol G et al., 1997).

És un limfoma amb una molt baixa incidència i a la literatura hi ha menys de 50 casos publicats (Reichard KK et al., 2007). L'edat mitja dels pacients és al voltant dels 36 anys i de predomini masculí. Es sol manifestar en estadis avançats i la localització majoritària és la de territoris ganglionars. No hi ha associació amb immunosupressió. Els pacients tenen una esperança de vida baixa que sol estar al voltant dels 11 mesos (Laurent C et al., 2009).

La morfologia de les cèl·lules tumorals té una aparença immunoblàstica o plasmablàstica on la infiltració sinusoïdal és freqüent (veure figura 7). Degut a la seva morfologia falsament cohesiva, de vegades es pot confondre amb un carcinoma, però a diferència d'aquests últims, no presenta positivitat per a les citoqueratines. Pràcticament no expressa marcadors de cèl·lula B; l'expressió de CD20 sol ser negativa o dèbilment positiva i focal, de la mateixa manera que l'expressió de CD30. La pràctica totalitat dels casos són positius per marcadors de cèl·lula plasmàtica com CD138 i també EMA. La majoria de casos expressen la cadena pesada IgA. L'expressió d'ALK és present en tots els casos, donat que és el marcador que el defineix com a entitat (veure figura 7). Tots els casos són EBV negatius (Swerdlow SH et al, 2008).

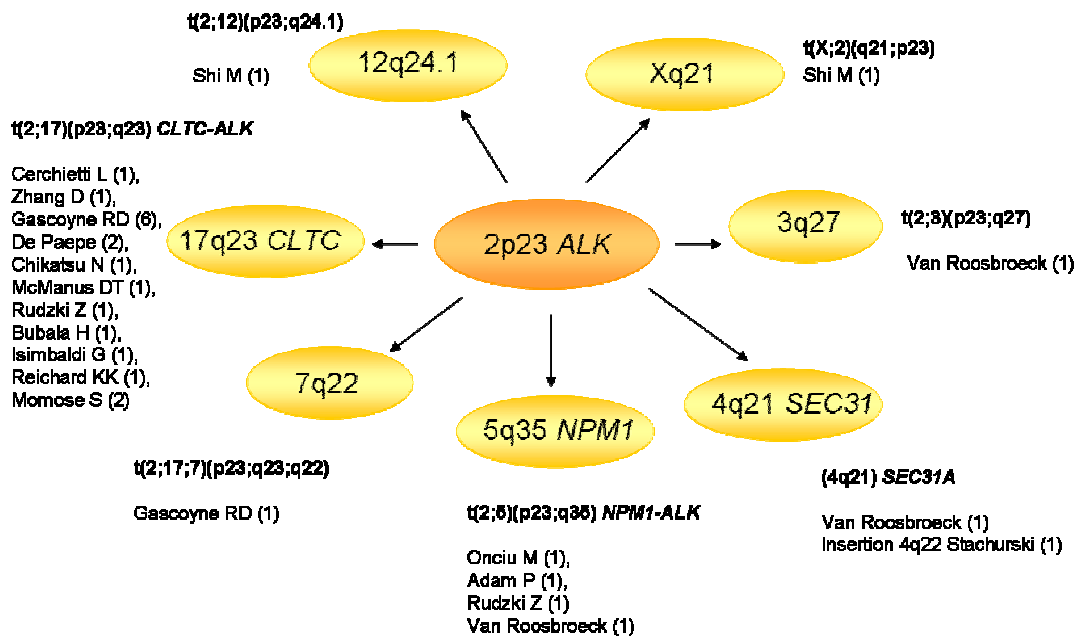
Figura 7. Imatge A corresponen a la hematoxilina-eosina d'un cas ALK+ LBCL. Imatge B corresponent a l'expressió d'ALK on s'evidencia un patró citoplasmàtic granular.



La sobreexpressió del gen *ALK* està deguda principalment al seu reordenament. La parella més comuna del reordenament és el gen de la Clatrina (*CLTC*) en la t(2;17)(p23;q23). També s'ha descrit com a parella del reordenament el gen de la nucleofosmina (*NPM1*) t(2;5)(p23;q35), el qual està associat a una sobreexpressió d'ALK nuclear i citoplàsmica. En total a la literatura fins ara s'han descrit 7 regions cromosòmiques i/o gens implicats en el

reordenament d'ALK en els casos d'ALK+ LBCL (veure figura 8) (Shi M et al., 2011; Van Roosbroeck K et al., 2010; Stachurski D et al., 2007; Onciu M et al., 2003; Adam P et al., 2003; Rudzki Z et al., 2005; Gascoyne RD et al., 2003; Cerchietti L et al., 2011; Zhang D et al., 2009; De Paepe P et al., 2003; Chikatsu N et al., 2003; McManus DT et al., 2004; Bubala H et al., 2006; Isimbaldi G et al., 2006; Reichard KK et al., 2007; Momose S et al., 2009). Donada la baixa incidència d'aquest tumor, la seva biologia no es coneix massa bé.

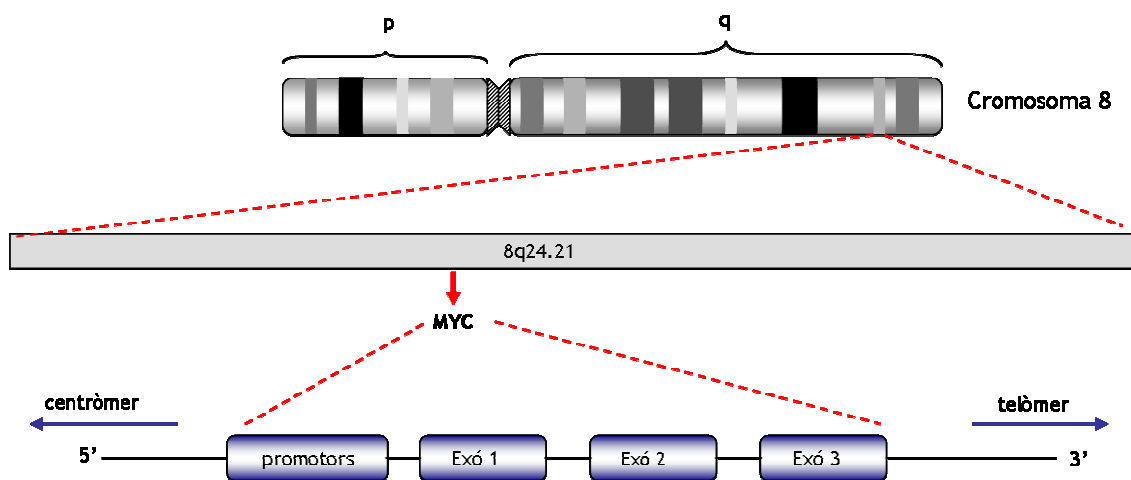
Figura 8. Les diferents parelles de reordenament d'ALK que hi ha descrites en ALK+ LBCL a la literatura. Entre parèntesi figuren el nombre de casos publicats amb aquesta translocació.



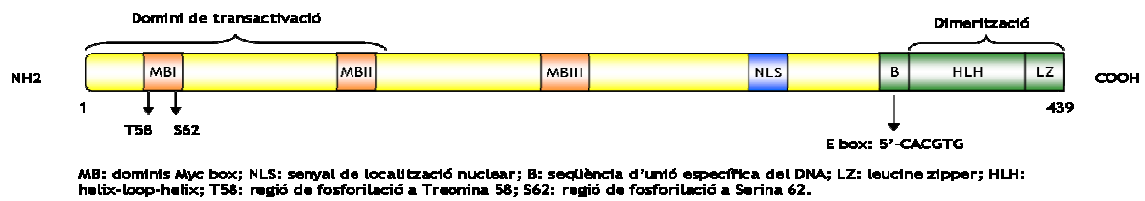
3.- MYC: gen i proteïna

El gen *MYC* (antigament conegut com a *c-MYC*) està localitzat al braç llarg del cromosoma 8 (8q24) i és membre d'una família de gens que inclou *MYCN* i *MYCL*, els quals varen ser dels primers gens descrits amb capacitat de transformació cel·lular. *MYC* està format per tres exons: l'exó I, que no és codificant, i pels exons II i III, que presenten múltiples pautes obertes de lectura que el codifiquen com a factor de transcripció (Dang CV, 2012) (veure figura 9). La senyal de començament de la traducció de l'exó 2 genera una proteïna nuclear de 439 aminoàcids (64KDa).

Figura 9. Localització i estructura del gen *MYC*



MYC pot activar i reprimir molts gens diana a través de diversos mecanismes, però el millor caracteritzat és l'activació de les dianes per mitjà de la caixa E de *MYC* (*MYC box E*) que conté un domini d'unió al DNA CACGTG. La caixa E de *MYC* es troba en el domini C-terminal juntament amb la regió bàsica, la regió "helix-loop-helix" i la regió "leucine zipper" (b/HLH/LZ) (Dang CV, 2012). El domini C-terminal li permet formar un dímer amb la proteïna *MAX*. *MYC-MAX* pot activar o reprimir la transcripció gènica a través del reclutament de complexos específics que modifiquen la cromatina. Tant el domini C-terminal com el domini de transcripció N-terminal són essencials per a l'activació i repressió del gens diana de *MYC*. El domini N-terminal inclou tres regions conservades anomenades caixes *MYC* (*MYC boxes*): *MYC I*, *MYC II* i *MYC III*, que són necessàries per a la completa activitat transcripcional (Meyer N et al., 2008). Aquest domini conté dues regions de fosforilació que estan implicades en l'estabilitat de la proteïna: la Serina 62 i la Treonina 58 (Klapproth K et al., 2010). És a dir, que l'activitat transcripcional de *MYC* està regulada per la fosforilació de la Serina 62 seguida per la fosforilació de la Treonina 58 i la subseqüent degradació pels proteosomes un cop que ja ha realitzat les seves funcions (veure figura 10).

Figura 10. Representació esquemàtica de les regions de la proteïna MYC.

L'activació oncogènica de *MYC* succeeix quan *MYC* es sobreexpressa o es desregula en els tumors. Aquesta activació oncogènica causa transformació de cèl·lules en cultiu i tumorigènesis en models animals. *MYC* regula l'expressió de més del 15% de gens cel·lulars. Promou el creixement cel·lular activant gens que augmenten el metabolisme i la biogènesi mitocondrial, i la biosíntesi d'àcids nucleics, ribosomes i proteïnes. *MYC* també és un mediador important de la progressió del cicle cel·lular, activant gens proliferatius que codifiquen per proteïnes tals com la ciclina D1, i inhibint proteïnes anti-proliferatives tals com inhibidors quinases dependent de ciclina. Així, *MYC* condueix la cèl·lula des de la fase G0/G1 a la fase S del cicle cel·lular. *MYC* també juga un paper important a l'apoptosi, estabilitzant la proteïna pro-apoptòtica i supressora de tumors p53 i, de manera indirecte, inhibint les proteïnes anti-apoptòtiques com BCL2, induint l'expressió de la proteïna pro-apoptòtica BIM i estimulant la sortida del citocrom C de la mitocondria (Slack GW et al., 2011).

4.- L'oncogen MYC en el desenvolupament de la cèl·lula B i en la limfomagènesi

És ben conegut en estudis de biologia tumoral que l'activació d'oncogens individuals o bé la pèrdua individual de gens supressors de tumors no és suficient per a induir la formació de tumors o tumorogènesi. Per a iniciar un procés tumoral es necessita més d'una mutació per cèl·lula. El primer model transgènic animal que es va utilitzar per estudiar la cooperació de diferents processos mutagènics en la formació de tumors va ser el gen *MYC* en la formació de limfomes o limfomagènesi. En aquests ratolins transgènics, *MYC* s'expressava sota el control de "l'enhancer" o activador del gen de la cadena pesada de les immunoglobulines ("ratolins $E\mu$ -*MYC*"). La sobreexpressió de *MYC* en ratolins transgènics comporta una expansió policlonal de cèl·lules B precursors, però no s'arriba a desenvolupar una neoplàsia monoclonal fins que no apareixen altres anomalies genètiques acompanyants al reordenament de *MYC*. En estudis posteriors que utilitzaven sistemes de mutagènesi d'inserció retroviral varen identificar oncogens que col·laboraven amb *MYC* i que acceleraven la limfomagènesi (Van Lohuizen M et al., 1991). Aquests estudis van mostrar l'existència d'una cooperació de diferents oncògens amb *MYC*, el que conduïa a una desregulació de la seva expressió i una conseqüent proliferació cel·lular; al mateix temps aquesta desregulació induïa alteracions en els mecanismes de la mort cel·lular o apoptosi (Naud JF et al., 2007). Diversos estudis en aquesta línia han suggerit que la supressió de l'apoptosi induïda per *MYC* és el mecanisme principal a través del qual els oncogens cooperen amb *MYC* durant la limfomagènesi.

En els òrgans hematopoètics, *MYC* és necessari per als estadis primerencs de desenvolupament de la cèl·lula B i T en el moll d'os i en el timus, respectivament. En els centres germinals, *MYC* és un regulador clau ja que és essencial per a la seva formació i manteniment (Vallespinós M et al., 2011; Douglas NC et al., 2001). Després de la trobada de l'antigen en els teixits limfoides secundaris, les cèl·lules B activades actuen conjuntament amb les cèl·lules fol·liculars dendrítiques (CFD) i les cèl·lules T fol·liculars que constitueixen els centres germinals, els quals donen lloc a dues àrees: la zona clara, on les cèl·lules B interactuen amb l'antigen, amb les CFD i amb les cèl·lules T antigen-específiques, i la zona fosca, on les cèl·lules es divideixen ràpidament. L'expressió de *MYC* en el desenvolupament dels centres germinals està restringida a l'inici de l'expansió de les cèl·lules B després de la presentació antigènica i en els estadis immediats de transició entre les zones del centre germinal. Estudis recents han localitzat l'expressió de *MYC* en una petita fracció de cèl·lules B de la zona clara i han demostrat que aquesta expressió depèn de l'antigen i de les interaccions de les cèl·lules T afins. Les cèl·lules B de la zona clara del centre germinal que expressen *MYC* presenten un fenotipus activat i s'estan dividint, la qual cosa suggereix que es troben sota una selecció positiva (tipificada per l'expressió del factor de transcripció IRF4). Pel contrari, les cèl·lules B proliferatives però de la zona fosca els manca aquesta expressió, com a la majoria de cèl·lules B de la zona clara (Calado DP et al., 2012) (veure figura 11 i 12).

En els centreblastes, l'expressió de *MYC* es veu reprimida per la transcripció del factor BCL6, i conseqüentment les cèl·lules de la zona fosca del centre germinal que sobreexpressen BCL6 els manca expressió de *MYC*. Contràriament, les cèl·lules B de la zona clara que

expressen MYC generalment els manca expressió de BCL6, la qual cosa facilita l'expressió de l'oncogen. La unió de BCL6 a la regió promotora del gen MYC contribueix a la relació inversa entre l'expressió de MYC i l'expressió de BCL6 (Dominguez-Sola D et al., 2012). Tot i així, quan MYC es reordena es poden perdre els llocs d'unió de BCL6 en el gen MYC, i si el reordenament de MYC és amb un dels gens de les IGs, els poderosos activadors ("enhancers") de les IGs que promouen la sobreexpressió de MYC també estarien venent aquest efecte represor de BCL6 sobre MYC. Les cèl·lules B del centre germinal a més, necessiten canviar ràpidament els estadis funcionals entre la zona clara i la fosca, i MYC és un candidat idoni per a regular aquest canvi dinàmic.

El patró específic d'expressió de MYC durant el desenvolupament del centre germinal té implicacions per a l'enteniment de la limfomagènesi conduïda per MYC. Les translocacions cromosòmiques que impliquen el gen MYC succeeixen en quasi tots els casos de BL i en aproximadament un 10% dels DLBCL. Aquestes translocacions semblen ser processos inicials del BL però processos progressius en el DLBCL. El descobriment de que en condicions normals les cèl·lules B de la zona clara expressen MYC suggereix que els reordenaments de MYC en el BL es podrien donar en aquestes cèl·lules de la zona clara, malgrat que les cèl·lules neoplàsiques del BL tinguin un patró d'expressió gènica similar al de la zona fosca. A més, s'ha pogut comprovar que l'expressió d'AID, l'enzim responsable d'induir trencaments de la doble cadena del DNA, és més elevada en les cèl·lules B de la zona fosca que en les de la zona clara que expressen MYC, la qual cosa assegura que els reordenaments de MYC en la zona clara siguin fets rars (Dominguez-Sola D et al., 2012).

En els BLs humans succeeixen una varietat d'anomalies genètiques que s'associen als reordenaments de MYC. Recentment, s'han descrit mutacions que afecten el factor de transcripció TCF3 (E2A) i el seu inhibidor el gen ID3, la majoria de les quals disminueixen la inhibició de ID3 sobre TCF3 (Schmitz R et al., 2012). El resultat és l'activació del programa d'expressió gènica de TCF3 en el BL, el qual és una característica inherent de les cèl·lules B normals del centre germinal. Una conseqüència principal de l'activitat de TCF3 en el BL és promoure l'activitat de PI3K, en part deguda a l'augment de senyalització del receptor de cèl·lula B (BCR). En cèl·lules B de ratolins la coexpressió de MYC i la de la subunitat catalítica de PI3K dona lloc a limfomes agressius amb fenotipus igual al de BL humà (Sander S et al., 2012). Així doncs, les senyals de PI3K semblen ser necessàries per a permetre a les cèl·lules B del centre germinal tolerar la prolongada sobreexpressió de MYC, la qual se sap que és tòxica en les cèl·lules normals en absència de factors de creixement. En cèl·lules normals de la zona clara que expressen MYC, l'abundant activitat de la via de NF-κB mitiga aquesta toxicitat (Dominguez-Sola D et al., 2012; Victora GD et al., 2012). Per altra banda, TCF3 té una major expressió en les cèl·lules de la zona fosca, la qual cosa podria explicar perquè les cèl·lules del BL malgrat expressar MYC tenen un fenotipus de cèl·lula de zona fosca (Schmitz R, Nature 2012).

Figura 11. El paper de MYC en els centres germinals i en alguns limfomes derivats del centre germinal. Adaptació de Arthur L. Shaffer AL et al., 2012.

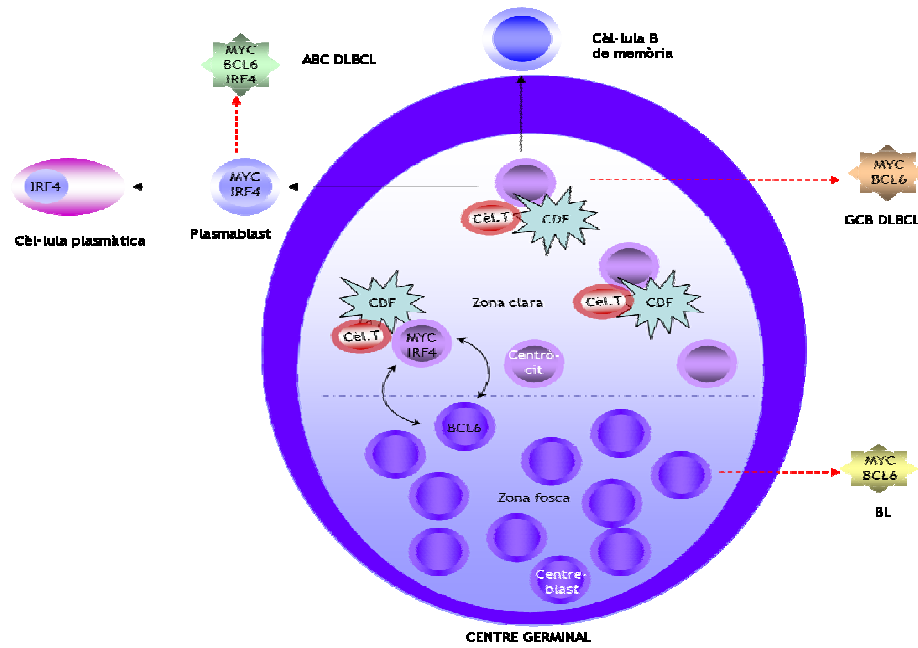
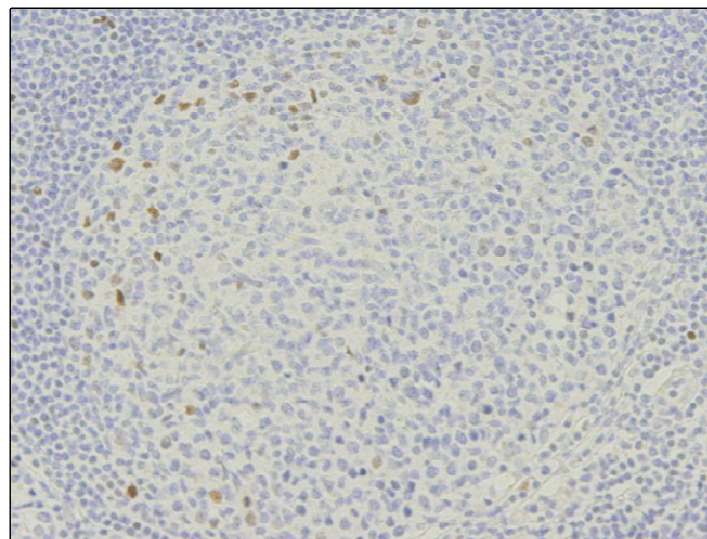


Figura 12. Imatge d'un centre germinal d'una amígdala normal amb expressió de MYC en un grup de cèl·lules de la zona clara (augment a 40x).

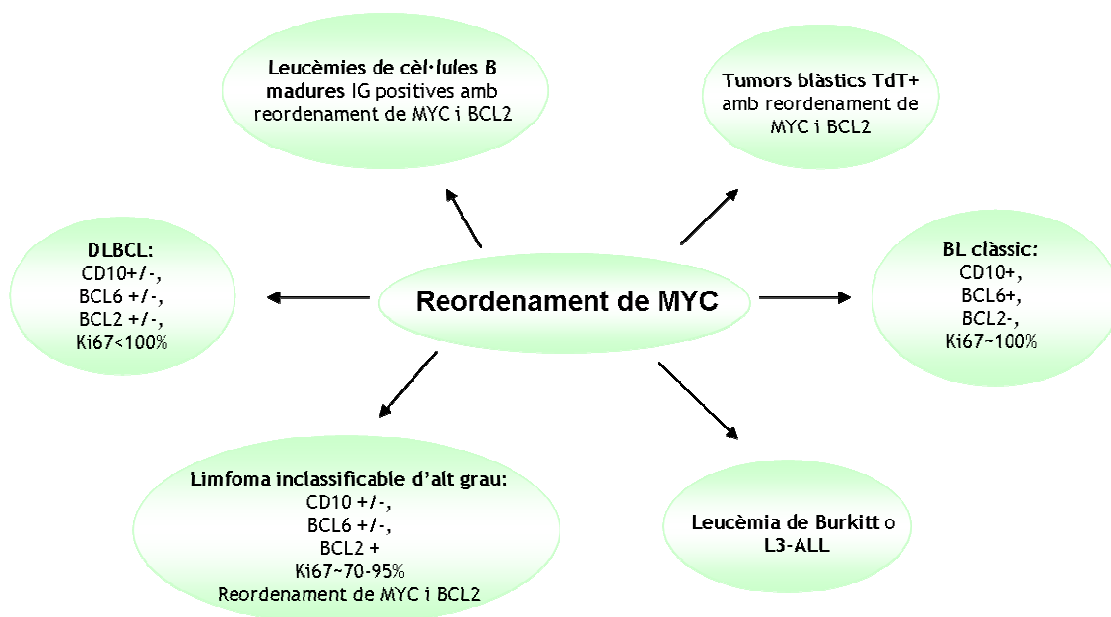


Malgrat que els estudis recents han incrementat el coneixement sobre la biologia de l'oncogen MYC, encara desconexim molt quin és l'impacte de la seva implicació en la patogènesi i comportament biològic dels limfomes B agressius.

5.- Desregulació de MYC en els limfomes B agressius.

La presència del reordenament de *MYC*, tant com una primera alteració citogenètica o al mateix temps que d'altres alteracions genètiques, ha estat descrita en diferents neoplàsies limfoides com el limfoma de Burkitt clàssic, el DLBCL, el limfoma no classificable amb característiques intermèdies entre BL i DLBCL (BCLU), el limfoma limfoblàstic (LBL) TdT positiu i la leucèmia de cèl·lula B limfoblàstica aguda i leucèmies de B madures (veure figura 13). El reordenament de *MYC* també pot ocórrer com un procés secundari essent un mecanisme involucrat en la transformació de limfomes més indolents a limfomes d'alt grau. Les alteracions secundàries de *MYC* han estat descrites en el limfoma fol·licular, en el limfoma de cèl·lules del mantell, en el mieloma de cèl·lules plasmàtiques i en el limfoma esplènic de cèl·lules velloses (Jaffe ES et al., 2011).

Figura 13. Esquema de la implicació del reordenament de *MYC* en els limfomes de cèl·lula B. Adaptació de Jaffe ES et al, 2011)



En la present tesi em centraré en la desregulació de *MYC* en el DLBCL, BL, BCLU, PBL i ALK+ LBCL.

5.1.- MYC en el limfoma difús de cèl·lula gran B

El reordenament del gen *MYC* s'ha descrit entre el 6% i el 14% de casos amb DLBCL (Akyurek N et al., 2012; Barrans SL et al., 2010; Green TM et al., 2012; Horn H et al., 2013; Hummel M et al., 2006; Johnson NA et al., 2012; Klapper W et al., 2008; Niitsu N et al., 2009; Savage KJ et al., 2009). Aquesta freqüència és més alta en pacients VIH positius i en casos de presentació extranodal (Jaffe ES et al., 2011). Existeix una certa tendència de l'associació del reordenament de *MYC* amb un perfil fenotípic GCB, donat que entre un 50-80% dels casos amb *MYC* reordenat expressen aquest fenotip (Niitsu N et al., 2009; Savage KJ et al., 2009, Barrans SL et al., 2010). Aquest reordenament forma part de la presència d'altres alteracions genètiques, és a dir, els casos de DLBCL amb reordenament de *MYC* solen formar part de cariotips complexos. *MYC* en aquests casos acostuma a reordenar-se amb els gens de les *IGs* en un 60% i en un 40% de casos es reordena amb gens *no-IGs* (Hummel M et al., 2006).

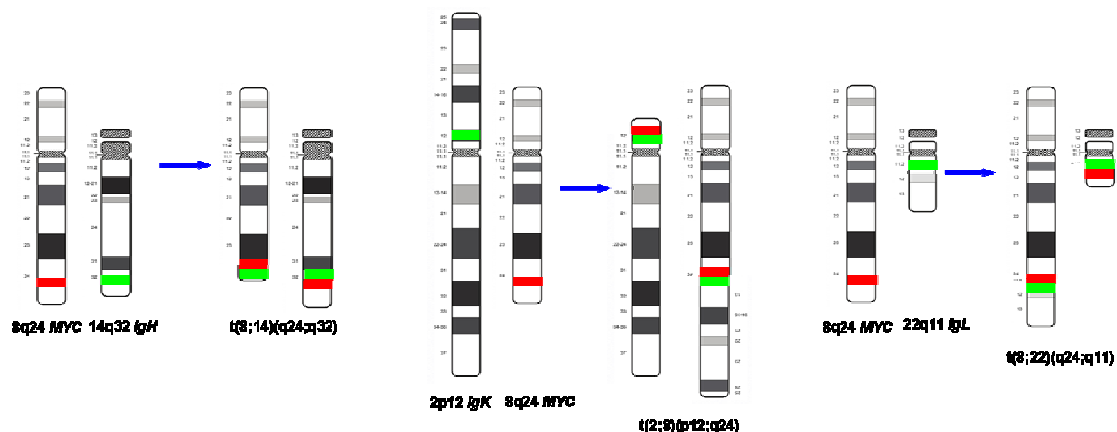
La presència del reordenament del gen *MYC* és un indicador de mal pronòstic en DLBCL tant en l'era pre-Rituximab (Kramer MH et al., 1998; Hummel M et al., 2006; Le Gouill S, Haematologica 2007; Tibiletti MG et al., 2009; Obermann EC et al., 2009) com a l'era Rituximab (Savage KJ et al., 2009; Barrans SL et al., 2010; Stasik CJ et al., 2010; Yoon SO et al., 2008). Estudis d'expressió gènica han demostrat que els casos de DLBCL amb reordenament de *MYC* presenten un mal pronòstic (Dave SS et al., 2006; Hummel M et al., 2006). El mal pronòstic d'aquests pacients no es deu únicament als reordenaments de *MYC*. La presència d'elevada activitat transcripcional del gen o l'augment en el nombre de còpies del gen, independentment del reordenament de *MYC*, també sembla conferir menor supervivència dels pacients (Kluk MJ et al., 2012; Schrader A et al., 2012; Stasick CJ et al., 2010; Yoon SO et al., 2008).

L'aplicació d'un nou anticòs monoclonal validat en mostres en parafina, està associant la presència d'aquest reordenament amb la sobreexpressió de la proteïna (Ruzinova MB et al., 2010; Tapia G et al., 2011; Green TM, Nielsen O et al., 2012). S'ha suggerit que una elevada sobreexpressió de *MYC* pot estar associada amb una inferior supervivència global en pacients tractats amb R-CHOP (Kluk MJ et al., 2012).

5.2.- MYC en el limfoma de Burkitt

El factor més important implicat en la patogènesi del BL és el reordenament de l'oncogen *MYC* (Dalla-Favera et al., 1982). En el BL clàssic la t(8;14)(q24;q32) està present en aproximadament del 75% al 80% dels casos, mentre que les seves variants la t(8;22)(q24;q11) i la t(2;8)(p12;q24) són menys freqüents. A nivell molecular la t(8;14) i les seves variants col·loquen el gen *MYC* localitzat a la regió 8q24 al costat d'un dels gens de les immunoglobulines *IG*: el gen de la cadena pesada (*IGH*) localitzat a la regió 14q32, el gen de la cadena lleugera kappa (*IGK*) localitzat a 2p12, o bé el gen de la cadena lleugera lambda (*IGL*) a la regió 22q11 (veure figura 14). Com a resultat d'aquestes translocacions amb els gens de les *IGs*, es perd el control de l'expressió normal de *MYC* conduint a l'expressió constitutiva de la proteïna a través del cicle cel·lular (Au WY et al., 2004).

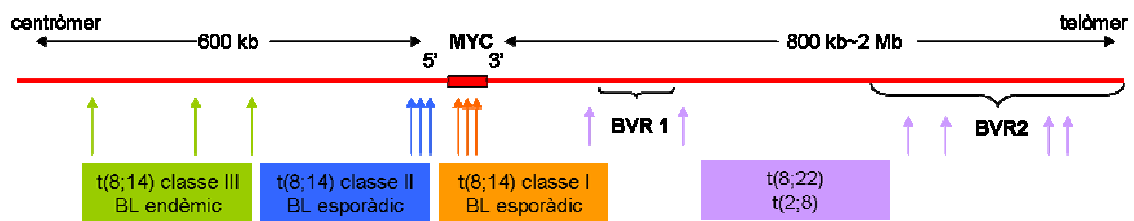
Figura 14. Esquema representatiu de les diferents translocacions de *MYC* amb els gens de les cadenes pesades i lleugeres de les immunoglobulines.



Els punts de trencament del gen *MYC* a la regió 8q24 depenen de les parelles de la translocació i presenten una considerable variació inter-individual. En el cas de la t(8;14) clàssica, els punts de trencament de la regió 8q24 succeeixen a la regió centromèrica (5') del gen *MYC*. Aquests punts de trencament s'han classificat segons la seva posició respecte al gen. Les translocacions amb punts de trencament en el primer exó o intró de *MYC* (5') s'han anomenat de classe I, aquelles translocacions que impliquen els punts de trencament immediatament després de les anteriors han rebut el nom de classe II, i aquelles que presenten punts de trencament més distants són les anomenades de classe III. En els casos de BL esporàdic o associat a immunodeficiència, les translocacions de classe I i II són les més predominants, mentre que en els casos de BL endèmic les més comuns són les de classe III amb punts de trencament que poden separar-se centenars de kilobases del gen *MYC*. La t(8;14) comporta l'activació de *MYC* en el derivatiu del cromosoma 14 mantenint intacte la regió codificant del gen. Les variants de la t(8;14) clàssica, tant la t(2;8) com la t(8;22) comporten la desregulació de *MYC* en el derivatiu del cromosoma 8, degut a la juxtaposició dels gens *IGK* o

IGL. Els punts de trencament del cromosoma 8 en aquestes variants estan localitzats a l'extrem (3') de *MYC* i poden localitzar-se a més de 2 Mb en el sentit telomèric del gen. Aquests punts de trencament reben el nom de regió variant de Burkitt tipus 1 (BVR1) i regió variant de Burkitt tipus 2 (BVR2) (veure figura 15) (Manolov G et al., 1986; Henglein B et al., 1989; Joos S, Haliska FG et al., 1992; Joos S, Falk MH et al., 1992; Zeidler R et al., 1994; Siebert R et al., 1998; Cario et al., Ratsch A et al., 2002; Haralambieva E et al., 2004; Einerson RR et al., 2006).

Figura 15. La regió 8q24, el gen *MYC* i els diferents punts de trencament descrits en el BL.



Els reordenaments de *MYC* amb les *IGs* en el BL es consideren fets primaris en aquest limfoma. Aquests reordenaments formen part d'un cariotip simple, és a dir, d'un cariotip sense o amb poques alteracions addicionals. Aproximadament en més de la meitat d'estudis de citogenètica convencional en BL no s'han trobat alteracions secundàries al reordenament de *MYC*. En aquells casos on s'han detectat alteracions secundàries, s'ha observat que les més freqüents són els augments en el nombre de còpies que implica 1q, el cromosoma 7 i el 12, i les pèrdues de 6q, 13q i 17p. L'augment de la complexitat cromosòmica està associada a un pitjor pronòstic en el BL (de Souza MT et al., 2011; Toujani S et al., 2009).

El gen *MYC* podria realitzar com a mínim dues funcions principals en el BL: participar en la proliferació cel·lular i en la desregulació de l'expressió de les molècules HLA de classe I, a més d'ajudar a les cèl·lules tumorals a evadir el control immunitari de l'hoste (God JM et al., 2010). El gen *MYC* també està implicat en la inducció al dany al DNA; l'aturada de la reparació de la doble cadena de DNA comporta l'augment de translocacions cromosòmiques. L'expressió constitutiva de *MYC* també s'ha descrit en l'augment de l'angiogènesi i la limfangiogènesi (Ruddell A et al., 2003).

Les respostes a la sobreexpressió de *MYC* no només augmenten la proliferació cel·lular sinó que també promouen l'apoptosi. Les alteracions genètiques addicionals que poden aparèixer poden transformar les senyals d'apoptosi associades a *MYC*, incloent alteracions d'altres gens que es solen trobar en casos de BL, mutacions del propi gen que anul·len la senyal d'apoptosi, o bé la infecció per EBV (Thorley-Dawson DA et al., 2008). Tot i que la sobreexpressió de *MYC* és una troballa freqüent en els casos de BL, aquesta sobreexpressió per si sola és insuficient per a induir el limfoma. Com s'ha descrit a l'apartat 3, la sobreexpressió de *MYC* en ratolins transgènics comporta una expansió policlonal de cèl·lules B precursors però no un desenvolupament de neoplasia monoclonal fins al cap d'un temps i per a l'aparició d'altres anomalies genètiques. Aquestes troballes suggereixen que tot i que el gen

MYC és important per al desenvolupament del BL, aquest pot ser més un cofactor o un pas inicial que requereix d'alteracions genètiques addicionals per a desenvolupar el fenotipus maligne complet.

S'ha demostrat que l'AID és necessària per al trencament de la doble cadena de DNA en la regió promotora del gen *MYC*; aquest fet juntament amb la formació de trencaments en el gen de l'*IGH*, estableix el paper de l'AID en la translocació *IGH-MYC* en les cèl·lules B neoplàsiques. La proximitat espacial d'aquests dos gens en el nucli podria també participar en la formació de la translocació (Ramiro AR et al., 2004). És difícil poder determinar una funció específica de l'oncogen *MYC* en el BL donat que també podem trobar alteracions del gen en altres limfomes B.

L'oncogen *MYC* es troba desregulat en la pràctica totalitat de casos de BL, tant a través de mecanismes de reordenament com de mutació del gen. La presència de mutacions del gen *MYC* són molt freqüents sobretot en els casos de BL endèmic amb la t(8;14) (Albert T et al., 1994). Aquestes mutacions de *MYC* poden alterar la transcripció del gen o influenciar en la fosforilació, estabilitat i activitat de la proteïna (Niklinski J et al.,2000). Tot i així, al voltant d'un 10% de casos amb BL o amb un perfil molecular de Burkitt, no es detecta el reordenament de *MYC* (Haralambieva E et al., 2004; Hummel M et al., 2006). Algunes investigacions suggereixen l'expressió alterada d'alguns micro-RNAs com a possibles contribuents a la patogènesi (Leucci E et al., 2008; Onnis A et al., 2010).

5.3.- MYC i el limfoma de cèl·lules B, no classificable, amb característiques intermèdies entre limfoma difús de cèl·lula gran i limfoma de Burkitt.

Aproximadament entre el 35% i el 50% dels casos presenten un reordenament de la regió 8q24/gen *MYC*. Tot i així, mentre el gen *MYC* en el BL es reordena amb un dels gens de les immunoglobulines, molts dels casos d'aquesta nova categoria ho fan amb altres gens que no pertanyen a les immunoglobulines. En aquestes translocacions els punts de trencament de *MYC* es troben a la regió més telomèrica i són similars als punts de trencament de les variants de les *IGs* de cadena lleugera del BL (Jaffe ES et al., 2011).

Un 15% del casos tenen *BCL2* reordenat, algunes vegades juntament amb el reordenament de *MYC* (els anomenats limfomes amb “double-hit”). La positivitat de *BCL2* en un cas que d'una altra manera podria ser classificat de BL pot suggerir la possibilitat d'un limfoma amb “double-hit”. Els limfomes que prèviament havien estat classificats com a limfomes “Burkitt-like”, poden tenir una elevada freqüència de casos amb reordenament de *MYC* i *BCL2* o amb “double-hit”. D'una manera menys freqüent també trobem el reordenament de *MYC* amb *BCL6* o *CCND1*. També es poden donar casos amb reordenament de *MYC*, *BCL2* i *BCL6*, els anomenats “triple-hits”.

Taula 4. Resum del trets genètics característics de la nova categoria i de BL i DLBCL.

	BL	BCLU	DLBCL
Reordenament de <i>MYC</i>	Present	Freqüent	Rar
<i>IG-MYC</i>	Present	Sovint	Rar
No <i>IG-MYC</i>	Absent	Sovint	Rar
“Doble-hit”	Absent	Sovint	Rar
Cariotip	Simple	Sovint complex	Freqüent complex
Reordenament de <i>BCL2</i> o <i>BCL6</i> però sense reordenament de <i>MYC</i>	Absent	Rar	Freqüent

5.4.- MYC en el limfoma plasmablàstic.

La desregulació del gen *MYC* en el limfoma plasmablàstic fou descrita per primer cop per Dawson i col·laboradors en un pacient VIH positiu amb presentació de la neoplasia a la cavitat oral (Dawson MA et al., 2007). Altres casos aïllats o petites sèries han descrit també la presència d'aquest reordenament en PBLs (veure taula 5).

Malgrat el baix nombre de casos de PBLs amb reordenament de *MYC* descrits a la literatura, la parella del reordenament era el gen de les *IGs*, sobretot el gen de la cadena pesada *IGH*. En aquells casos en els quals es va poder realitzar estudis de citogenètica convencional es va observar un cariotip complex acompanyant al reordenament de *MYC* en la majoria d'ells (Seegmiller AC et al., 2010; Bogusz AM et al., 2009; Chuah KL et al., 2009; Yotsumoto M et al., 2009; Taddesse-heath L et al., 2010).

Taula 5. Estudis de citogenètica convencional en els PBLs publicats a la literatura que presenta reordenament de la regió 8q24.

Autor	Cariotip
Chuah KL <i>et al.</i>	46, XY, t(8;14)(q24;q32), t(20;22)(q13.3;q13) [20]
Yotsumoto M <i>et al.</i>	46, XY, t(8;14)(q24;q32), add(14)(q32), der(21)t(1;21)(q12;p11) [20]
Bogusz AM <i>et al.</i>	47, XY, add(6)(p23), +7, add(8)(p23), t(8;14)(q24.1;q32), der(13)t(13;15)(p12;q13), der(21)t(1;21)(q12;q22) [13]/46, XY [7] 48-49, XX, del(1)(p34.1p36.3), add(2)(p11.2), add(2)(q31), der(8)t(8;8)(p23;q11.2), der(8)t(8;14)(q24.1;q32), add(9)(p22), der(12)t(1;12)(q21;p13) ins(12;?)(p13;?) add(12)(q24.1), add(13)(p11.2), add(14)(q32), der(14) add(14)(p11.2) t(8;14)(q24.1;q32), +15, add(16)(q22), add(17)(p11.2), add(21)(q22), +3-4 mar [cp4]
Seegmiller AC <i>et al.</i>	46, XY, t(8;14)(q24.1;q32) [20]
Taddesse-Heath L <i>et al.</i>	83-85, XX, -Y, +1, der(1)t(1;1)(p32;q25), +2, +3, +4, +6, del(6)(q25)x2, +7, +7, t(8;14)(q24.1;q32)x2, +10, +12, add(13)(q34), +16, psudic(16;1)(q12;p13), +17, +18, +19, +20, +22, +mar[cp20] 47-49, X, +X, -Y, der(1)t(1;4)(q21;p12), +3, del(3)q(13.2q23)x2, +5, +6, der(6)psu dic(6;1)(p25;p36.3) ins(6;?)(p25?), t(7;10)(q22;q22), t(8;22)(q24.1;q11.2), add11(q23), -13, -20[cp20] 46, X, -Y, t(2;8)(p12;q24.1), -4, der(6)t(5;6)(p12;q25), +7, +15, der(15;17)(q10;q10), +20[6]/46, XY [14]

5.5.- MYC en el limfoma de cèl·lules grans B ALK positiu

Es coneix ben poc sobre la presència d'alteracions genètiques de *MYC* en els ALK+ LBCLs, en part deguda a la poca freqüència d'aquests limfomes. De la literatura publicada sobre aquests limfomes fruit de tècniques de citogenètica convencional o a partir de CGH s'han descrit alteracions numèriques de la regió 8q24 en un context de cariotip complex, i la majoria de les vegades aquestes alteracions implicaven a tot el cromosoma 8 (veure taula 6) (Cerchiatti L et al., 2011 ; Shi M et al., 2011; Zhang D et al., 2009; De Paepe P et al., 2003 ; Adam P et al., 2003; Stachurski et al., 2007 ; Ishii K, et al., 2005).

Taula 6. Recull de les alteracions del cromosoma 8 descrites en ALK+ LBCLs.

Autor	Cariotip o CGH
Cerchiatti L <i>et al.</i>	74-91, XXXX, del(1)(p10q35), t(2;17)(p23;q23)x2, add(2)(p11), der(4)(4;15)(p14;q15), add(7)(q34-q35)x2, add(17)(p11)x2, inc [cp15] // guanyes: 1q, 3q13.31-qtel, 8, 11p13, 19p. Pèrdues: 1p, 2q22.1-qtel, 4q12-qtel, 7q36.3, 10, 13q11-q21.32, 13q21.33-q22.2, 17ptel-p13.1, 17q22, 19q, Xp21.1-q21.31, Xq21.33-q22.1, Xq22.3-qtel.
Shi M <i>et al.</i>	76-79, der(X)t(X;2)(q21;p23)x2, -Y, -Y, -1, dic (1;14)(p36.1;p11.2), del(2)(p23)x2, del(3)(q27)x2, add(4)(q21), -5, add(5)(p13), add(6)(q21), del(6)(q21), add(7)(q11.2)x2, -8, der(8;3)(q10;q10), add(8)(q24)x2, -9, -10, -11, add(12)(q13), del(12)(p11.2), der(12)t(2;12)(p23;q24.1), +13, -14, -14, -15, add (15)(p11.2), -17, -17, +19, add(19)(p13)x2, -22, -22, -22, +1-2 mars
Zhang D <i>et al.</i>	85-87,XXY, i(1)(q10), add(2)(p23), +3, dlc(3)t(3;7)(p23;q11.2), +3, +del(4)(q21), +del(5)(q13), +der(5)t(3;5)(p13;q22), +6, +del(7)(q11.2), +8, add(9)(q34.1), t(9;14)(q13;q32), add(11)(p14), i(11)(q10), der(13;13)(q10;q10), der(15)t(1;15)(q21;p13), -16, 17x2, +18, +19, +20, +21
De Paepe P <i>et al.</i>	46-47,XX, i(1)(q10),der(2) add(2)(p13)t(2;3)(q37;q21), der(5)t(3;5)(q25;q34), add(6)(q10), +der(6)t(6;14)(p21;q11), +8, del(10)(p12), ?inv(12) (q15q24), -14,add(17)(p11), add(17)(q15), +19, inc[cp7]
Adam P <i>et al.</i>	35-48,XY,-1,t(1;14)(q21or23;q32), t(2;5)(p23;q35), -4, +der(8), inv(11)(p11p15), der(11)t(7;11)(q22or31;q21), -11, der(14)t(1;14)(q21or23;q32),+21
Stachurski D <i>et al.</i>	87, X, -X, -Y, -Y, +1, add(1)(p13)x2, +6, add(6)(q12)x2, -8, add(8)(p11.1), -9, -10, -18, + mar
Ishii K <i>et al.</i>	82, XY, add (X)(q22), +1, add(1)(p11)x2, -2, add (2), +3, add(5)(q31)x2, +del(6)(q?), +8, +add (11)(p15), +12, -14, +16, del (16)(p13)x2, +18, +mar1, +mar2, +mar3, +mar4x2, +mar5, +mar6, +mar7 [cp6] // 83, idem, +add (3)(p13), -4, del (6), +7, t(7;8)(p15;p23), ?9, -del(16), +17, add(18)(p11), +21, -mar2, +mar [1] // 81, idem, + add(3)(p11), add(3)(q12), -6, -15, -del(16), -18, -mar2, -marS, -mar7, +Smar [1] // 46, XY [4]

Hipòtesis i objectius

Es ben conegut a la literatura que *MYC* s'expressa prototípicament en totes les variants de BL (endèmica, esporàdica i associada a immunodeficiència), i normalment succeeix com a resultat de translocacions equilibrades. La presència del reordenament de *MYC* és part essencial en el diagnòstic de Burkitt, però no és específic d'ell. Els limfomes de cèl·lula B amb presència del reordenament de *MYC* però que no són BL solen ser clínicament agressius, més resistents a teràpies estàndard, i associats a una mortalitat més elevada.

Sobre aquestes premisses, aquesta tesi es planteja d'acord amb les següents **hipòtesis**:

1.- Les alteracions genètiques de *MYC* poden tenir impacte pronòstic en pacients amb DLBCL *de novo* tractats amb R-CHOP (**Treball 1**).

2.- La repercussió a nivell proteic de les alteracions genètiques de *MYC* no estan ben definides. Els reordenaments de *MYC* donen lloc a una sobreexpressió de la proteïna. L'expressió proteica de *MYC* no s'ha correlacionat amb les seves alteracions genètiques. La implicació pronòstica de l'expressió proteica de *MYC* en DLBCL *de novo* tractats amb R-CHOP no està ben establerta (**Treball 1**).

3.- Les alteracions genètiques de *MYC* i altres oncogens alterats en el DLBCL poden estar presents també en els PBL amb freqüències diferents i jugar un paper important en la seva patogènesi (**Treball 2**).

4.- Els ALK+ LBCLs són limfomes B agressius amb diferenciació plasmocel·lular, infreqüents, poc definits, en els que no es coneix el paper de *MYC* en la seva patogènesi (**Treball 3**).

L'**objectiu general** de la present tesi és estudiar la implicació del gen *MYC* en la patogènesi d'una sèrie de limfomes B agressius analitzant la desregulació i activació de l'oncogen a nivell genètic i a nivell proteic mitjançant tècniques d'hibridació in situ fluorescent i de immunohistoquímica i avaluar el seu impacte pronòstic a la supervivència.

De forma particular, s'han plantejat els següents **objectius específics**:

1.- Determinar si les alteracions genètiques de *MYC* tenen un impacte pronòstic en una sèrie llarga de pacients amb diagnòstic de DLBCL *de novo* i tractats amb immunoquimioteràpia. (**Treball 1**).

2.- Estudiar la sobreexpressió proteica de *MYC* i la correlació amb el seu estatus genètic, així com el seu valor pronòstic en els pacients amb DLBCL *de novo* tractats homogèniament (**Treball 1**).

3.- Avaluar les alteracions genètiques i proteïques de *BCL2*, *BCL6* i *MALT1* en la mateixa sèrie de pacients amb DLBCL, la seva associació amb les troballes genètiques i proteïques de *MYC* i el seu impacte pronòstic (**Treball 1**).

4.- Definir si les alteracions genètiques de *MYC*, *BCL2*, *BCL6*, *MALT1*, *PAX5* i *IGH* estan presents en el PBL i altres limfomes agressius amb diferenciació plasmablàstica (**Treball 2**).

5.- Avaluar i estudiar les correlacions entre les alteracions genètiques i les variables clinicopatològiques en els PBLs (**Treball 2**).

6.- Estudiar l'estatus genètic i la sobreexpressió proteica de *MYC* en una sèrie de casos d'ALK+ LBCL i comparar-los amb altres limfomes B agressius amb característiques plasmablàstiques (**Treball 3**).

7.- Determinar les proteïnes implicades en el programa de diferenciació plasmocel·lular en els ALK+ LBCL (**Treball 3**).

8.- Determinar l'activació d'STAT3, un factor de transcripció implicat en la diferenciació de cèl·lula plasmàtica, analitzant l'expressió de la seva forma fosforilada i avaluar la possible correlació amb la desregulació de *MYC* (**Treball 3**).

Resultats

Treball 1

L'expressió proteica i les alteracions genètiques de MYC tenen impacte pronòstic en el limfoma difús de cèl·lula gran B tractat amb immunoquimioteràpia

(Haematologica 2013; May 28: Epub ahead of print)

Resum

Les alteracions de *MYC* tenen influència sobre la supervivència dels pacients amb DLBCL. La majoria d'estudis s'han centrat en els reordenaments de *MYC* però en canvi no es coneix bé l'impacte pronòstic de les alteracions numèriques i de l'expressió proteica. En aquest estudi vam analitzar les alteracions genètiques i l'expressió proteica de *MYC*, *BCL2*, *BCL6* i *MALT1* en 219 DLBCLs. El reordenament de *MYC* com a única anomalia (*MYC* "single-hit") es va observar en un 3% dels casos, el reordenament de *MYC* alhora que el de *BCL2* i/o *BCL6* (*MYC* "double/triple-hit") en un 4%, les amplificacions de *MYC* en un 2% i els guanys en un 19% dels casos. *MYC* "single-hit", *MYC* "double/triple-hit" i les amplificacions de *MYC* es van associar amb una pitjor supervivència global i progressió lliure de malaltia. L'expressió proteica de *MYC*, es va avaluar mitjançant un sistema d'anàlisi d'imatges. Es va observar una correlació entre les alteracions genètiques i l'expressió proteica de *MYC*. Tanmateix, l'estudi immunohistoquímic de *MYC* va identificar un subgrup de pacients amb un pronòstic desfavorable. A més, la combinació de l'expressió de *MYC* i *BCL2* millorava l'avaluació del pronòstic. Els tumors que presentaven expressió tant de *MYC* com de *BCL2* a nivell proteic eren els que mostraven pitjor supervivència, mentre que els tumors doble negatius eren els de millor resultat. L'expressió elevada de *MYC* es va associar amb un supervivència global més curta independentment de l'Índex Pronòstic Internacional (IPI) o de l'expressió de *BCL2*. En conclusió, l'expressió proteica de *MYC* identifica un subtipus de DLBCL amb un pronòstic molt desfavorable independentment de les alteracions genètiques o d'altres paràmetres pronòstics.

ARTICLE

MYC protein expression and genetic alterations have prognostic impact in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with immunochemotherapy

Alexandra Valera,¹ Armando López-Guillermo,¹ Teresa Cardesa-Salzmann,¹ Fina Climent,² Eva González-Barca,³ Santiago Mercadal,³ Íñigo Espinosa,⁴ Silvana Novelli,⁴ Javier Briones,⁴ José L. Mate,⁵ Olga Salamero,⁵ Juan M. Sancho,⁵ Leonor Arenillas,⁶ Sergi Serrano,⁶ Nadina Erill,⁷ Daniel Martínez,¹ Paola Castillo,¹ Jordina Rovira,¹ Antonio Martínez,¹ Elias Campo¹ and Luis Colomo²; Grup per l'Estudi dels Limfomes de Catalunya i Balears (GELCAB)

¹Departments of Pathology and Hematology, Hospital Clinic de Barcelona, Institut d'Investigacions Biomèdiques Agustí Pi Sunyer (IDIBAPS), Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain; ²Hospital Universitari de Bellvitge-IDIBELL, ³Institut Català d'Oncologia, Hospital Duran i Reynals-IDIBELL, Hospitalet del Llobregat, Spain; ⁴Hospital de Sant Pau, Barcelona, Spain; ⁵Hospital Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain; ⁶Hospital del Mar, Barcelona, Spain; ⁷Althaia Laboratoris, Barcelona, Spain

ABSTRACT

MYC alterations influence the survival of patients with diffuse large B-cell lymphoma. Most studies have focused on *MYC* translocations but there is little information regarding the impact of numerical alterations and protein expression. We analyzed the genetic alterations and protein expression of *MYC*, *BCL2*, *BCL6*, and *MALT1* in 219 cases of diffuse large B-cell lymphoma. *MYC* rearrangement occurred as the sole abnormality (*MYC* single-hit) in 3% of cases, *MYC* and concurrent *BCL2* and/or *BCL6* rearrangements (*MYC* double/triple-hit) in 4%, *MYC* amplifications in 2% and *MYC* gains in 19%. *MYC* single-hit, *MYC* double/triple-hit and *MYC* amplifications, but not *MYC* gains or other gene rearrangements, were associated with unfavorable progression-free survival and overall survival. *MYC* protein expression, evaluated using computerized image analysis, captured the unfavorable prognosis of *MYC* translocations/amplifications and identified an additional subset of patients without gene alterations but with similar poor prognosis. Patients with tumors expressing both *MYC/BCL2* had the worst prognosis, whereas those with double-negative tumors had the best outcome. High *MYC* expression was associated with shorter overall survival irrespectively of the International Prognostic Index and *BCL2* expression. In conclusion, *MYC* protein expression identifies a subset of diffuse large B-cell lymphoma with very poor prognosis independently of gene alterations and other prognostic parameters.

Introduction

MYC is a pleiotropic transcription factor involved in many different cellular processes. The oncogenic activation of *MYC* may occur by direct gene alterations such as translocations and amplifications or by dysregulation of upstream signaling pathways. *MYC* translocation is a recurrent genetic alteration in aggressive B-cell lymphomas such as Burkitt's lymphoma (BL), diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) and B-cell lymphoma, unclassifiable with features intermediate between DLBCL and BL (BCLU). BCLU is a provisional category recently introduced in the World Health Organization (WHO) classification to identify a group of poorly characterized, very aggressive lymphomas. These tumors have variable morphology, most are CD10-positive and carry secondary *MYC* translocations frequently associated with additional genetic alterations.^{1,3} Approximately, 40 to 80% of these cases have additional rearrangements of *BCL2* and/or *BCL6* genes, and have been referred to as double- or triple-hit lymphomas.^{4,6} However, the precise borders of BCLU are not well-defined yet.²

DLBCL is a heterogeneous disease with varied clinical, morphological and genetic features. *MYC* translocations have

been observed in 6% to 14% of cases.⁷⁻¹⁵ The addition of rituximab (R) to the classic CHOP (cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine and prednisone) chemotherapy has significantly improved the outcome of these patients. Nevertheless, 30% to 40% of them die of the disease usually within 1-2 years after the diagnosis and it is necessary to identify such poor-risk patients who may benefit from alternative treatment strategies. The International Prognostic Index (IPI) as well as most of the gene-signatures that classify DLBCL into prognostically significant groups have retained their significance after the use of R-CHOP schemes.^{16,17} However, to date a molecular classification is not feasible in routine clinical practice and translational results of gene expression profiling (GEP) data are necessary.¹⁸

GEP studies also recognized a subset of DLBCL with molecular signatures resembling BL and an unfavorable outcome if treated with non-intensive chemotherapy. Most of these cases carried a *MYC* translocation but corresponded to classical DLBCL by morphology and immunophenotype and were unidentifiable by these methods, increasing the need of methods to recognize such tumors.^{11,19} Furthermore, studies using gene set enrichment analysis showed that high *MYC* transcriptional activity confers a poorer survival to patients

©2013 Ferrata Storti Foundation. This is an open-access paper. doi:10.3324/haematol.2013.086173

The online version of this article has a Supplementary Appendix.

Manuscript received on February 12, 2013. Manuscript accepted on May 17, 2013.

Correspondence: lcolomo@clinic.ub.es

with DLBCL independently of the presence of *MYC* translocations.^{20,21} Other studies have demonstrated higher levels of *MYC* mRNA in DLBCL with increased gene copy numbers and correlated these results with an unfavorable prognosis.^{22,23} In brief, all these studies indicate the importance of identifying *MYC* genetic changes in DLBCL. However, most of these studies evaluated only the impact of isolated changes of the *MYC* gene, were performed in small series of patients, or considered patients treated with CHOP and R-CHOP chemotherapy.^{15,22,23} At the protein level, high expression of *MYC* detected by immunohistochemistry may be useful to identify cases with *MYC* translocations.^{20,24,25}

In this study we investigated the clinical impact of the spectrum of *MYC* gene alterations and *MYC* protein expression in DLBCL in comparison to that of other gene alterations.

Methods

The methods are fully described in the *Online Supplementary Appendix*. Briefly, data regarding 219 patients (125 males, 94 females; median age, 61 years) consecutively diagnosed with *de novo* DLBCL between 2002 and 2007 were retrieved from the files of five institutions of the *Grup per l'Estudi dels Limfomes de Catalunya i Balears* (GELCAB). All tumors were classified as DLBCL according to the current WHO classification and no immunodeficiency-associated lymphomas or transformed low-grade lymphomas were included. Informed consent was obtained from all the patients according to the guidelines of the different Ethic Committees.

The diagnostic samples were reviewed by expert hematopathologists (LC, FC, JLM, SS, IE, EC) from the five hospitals involved in the study. Tissue microarrays were constructed and the immunohistochemical studies included CD10 (clone 56C6), MUM1/IRF4 (clone MUM1p), BCL2 (clone 124), and Ki-67 (clone MIB-1) (all from Dako), BCL6, kindly provided by Dr. Roncador (Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, Madrid, Spain), and *MYC* (clone Y69, Epitomics, USA). The conditions for all these antibodies and their evaluation were as previously described and followed the guidelines recommended for their interpretation by the Lunenburg Lymphoma Biomarker Consortium.^{26,27} The cut-off used to determine BCL2 expression was 50%, similar to that used in other studies.¹² *MYC* was evaluated using computerized image analysis with Aperio ImageScope software, version 9.0.0.1521 (Aperio Technologies, Vista, CA, USA). A mean number of 7000 cells were evaluated per case (range, 850-50000 cells). To select the optimal cut-off of the quantitative *MYC* assessment for predicting survival, a maximally selected rank statistics test was performed using the Maxstat package (R statistical package, version 2.8.1, Vienna, Austria).²⁸ The best threshold obtained was 10% of positive cells, as shown in *Online Supplementary Figure S1*.

Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) using split signal probes for *BCL2*, *MALT1*, *BCL6* and *MYC* genes was performed as previously described²⁹ and the cut-off values for the interphase FISH analyses were established following the criteria of Ventura.³⁰ Gains were considered when three or four copies of the gene studied were identified, whereas more than four copies were considered as amplifications.³¹ However, as we did not use a centromer probe in this study, we cannot distinguish between true polysomies and partial chromosomal gains.

Categorical data were compared using Fisher's exact test and a two-sided *P* value, whereas non-parametric tests were used for

ordinal data. Standard definitions of complete response, progression-free survival and overall survival were used.³² The actuarial survival analysis was carried out according to the method described by Kaplan and Meier and the curves compared by the log-rank test.³³ The multivariate analyses for survival were performed using the stepwise proportional hazards model (Cox).³⁴

Results

Clinical features

The patients' main clinical features at diagnosis are presented in Table 1. Eleven patients who received no treatment were excluded from the survival analyses. All the remaining patients received immunochemotherapy, including adriamycin-containing regimens in 196 cases (185 received R-CHOP, and 11 patients received R-high dose-CHOP/ R-ESHAP schemes; etoposide, methylprednisolone, high-dose cytarabine and cisplatin). One hundred forty-three of 202 patients (71%) with assessable response reached a complete response. The median progression-free survival was 7.5 years. After a median follow-up of 5.2 years for surviving patients, 87 patients had died, with a 5-year overall survival rate of 60% [95% confidence interval (CI): 53-67].

Morphology and immunohistochemistry

One hundred fifty-three out of the 219 cases (70%) were classified as centroblastic, 20 (9%) as immunoblastic and 46 (21%) as other variants. The phenotype of these tumors included CD10-positivity in 54/199 (27%), BCL6-positivity in 112/197 (57%) and MUM1/IRF4-positivity in 93/185 (50%). BCL2 was expressed in 95/164 cases (58%).

MYC protein immunostaining was studied by a computerized method in 168 cases and the protein was found to be expressed (cut-off 10%) in 81/168 (48%) cases. In all positive cases, *MYC* was expressed only in the nucleus. Since the cut-off for *MYC* immunohistochemistry was 40% in other studies, we also performed the same analyses using this value; with this cut-off, only 21 cases (13%) showed *MYC* overexpression (*Online Supplementary*

Table 1. Clinical features of 219 patients with *de novo* DLBCL.

Clinical features	N. of cases
Median age (range)	61 (19-91)
≥ 60 years	123/216 (57%)
Gender	
Female	94/219 (43%)
Male	125/219 (57%)
Extranodal involvement	82/192 (43%)
Ann Arbor stage (III-IV)	122/209 (58%)
High serum LDH	95/187 (51%)
High serum β2 microglobulin	75/151 (50%)
International Prognostic Index (risk)	
Low	69/200 (35%)
Low/intermediate	40/200 (20%)
High/intermediate	45/200 (23%)
High	46/200 (23%)
Response	
Complete response	143/202 (71%)
Partial response	19/202 (9%)
No response/progression	40/202 (20%)

Material).^{9,10,12} In addition we also evaluated MYC immunostaining in a semi-quantitative manner finding a good correlation with the digital method. All the information on the semi-quantitative approach, the relationship with the digital method and the impact on the outcome of the patients is shown in the *Online Supplementary Material (Online Supplementary Table S1, Online Supplementary Figures S2, S3C and S3D, and Online Supplementary Methods)*.

MYC, BCL2, BCL6 and MALT1 genetic alterations

Table 2 presents a summary of the genetic alterations. The highest incidence of alterations was detected for *BCL6*, 71/165 (43%) cases, followed by *BCL2* 65/172 (38%), *MYC* 49/176 (28%) and *MALT1* 37/164 (23%). In 117 of 167 (70%) cases with complete information at least one genetic alteration was recognized using these probes.

Twelve of 176 (7%) evaluable cases had *MYC* rearrangements, present in a median of 90% of the neoplastic cells (range, 20-100%). Four cases had *MYC* rearrangement as the sole abnormality (*MYC* single-hit). One additional case with *MYC* rearrangement had only gains of *BCL6* and was also included in this group. Simultaneous rearrangements of *MYC* and *BCL2* or *BCL6* (*MYC* double-hit) were identified in five cases: four had

MYC and *BCL2* rearrangements and one had *MYC* and *BCL6*. Two additional cases presented triple-hit *MYC-BCL2-BCL6*; one case had a non-*MYC* double-hit, simultaneously involving the *BCL2* and *BCL6* genes. Among ten evaluable *MYC* rearranged tumors, eight cases were *IGH/MYC* and two non-*IGH/MYC*. Gains and amplifications of *MYC* were identified in 34/176 (19%) and 3/176 (2%) cases, respectively.

Based on the type of alterations of *MYC* we classified the tumors into five groups, which had particular clinic-pathological and genetic characteristics summarized in Tables 3 and 4. These groups were *MYC* negative (*MYC* without alterations), *MYC* gained, *MYC* amplified, *MYC* single-hit, and *MYC* double/triple-hit. The correlations between morphological and immunophenotypic features are shown in Table 3. The 12 tumors with *MYC* breaks were classified as centroblastic in eight cases (5 *MYC* double/triple-hit and 3 *MYC* single-hit), immunoblastic in two cases (both *MYC* single-hit) and not otherwise specified in the other two cases (*MYC* double/triple-hit). *MYC* double/triple-hit lymphomas were more frequently CD10 and BCL6-positive (5/7, 71%) and MUM1-negative (5/7, 71%). Of note, all double/triple-hit cases overexpressed BCL2, usually very strongly, whereas *MYC* single-hit cases had lower or no expression of BCL2.

Table 2. Genetic alterations detected by FISH.

Gene	Rearranged	Gained	Amplified
MYC			
Cases	12/176 (7%)	34/176 (19%)	3/176 (2%)
Cells with genetic alteration [median (range)]	90% (20-100%)	86% (66-97%)	97% (91-100)
Mean copy number (SD)	-	3.3 (2.7-4.1)	6.5 (4.6-10)
BCL2			
Cases	26/172 (15%)	26/172 (15%)	13/172 (8%)
Cells with genetic alteration [median (range)]	96% (65-100%)	77% (57-100%)	100% (82-100%)
Mean copy number (SD)	-	3.3 (3-4.3)	6.2 (4.4-8.9)
BCL6			
Cases	46/165 (28%)	22/165 (13%)	3/165 (2%)
Cells with genetic alteration [median (range)]	84% (15-100%)	90% (54-100%)	100% (97-100%)
Mean copy number (SD)	-	3.3 (2.8-3.9)	5.0 (4.3-5.6)
MALT1			
Cases	1/164 (1%)	28/164 (17%)	8/164 (5%)
Cells with genetic alteration [median (range)]	70%	86% (54-100%)	100% (77-100%)
Mean copy number (SD)	-	3.3 (2.8-4.0)	6.0 (4.7-8.6)

Table 3. Morphological and immunophenotypic features related to *MYC* alterations.

	MYC negative	MYC gained	MYC amplified	MYC-SH	MYC-DH/TH
Morphology					
Centroblastic	94/127 (74%)	26/34 (76%)	2/3 (67%)	3/5 (60%)	5/7 (71%)
Immunoblastic	7/127 (6%)	3/34 (9%)	1/3 (33%)	2/5 (40%)	0/7
Other	26/127 (20%)	5/34 (15%)	0/3	0/5	2/7 (29%)
Immunohistochemistry					
CD10+	30/121 (25%)	10/32 (31%)	0/3	1/4 (25%)	5/7 (71%)
BCL6+*	70/121 (58%)	24/31 (77%)	3/3 (100%)	2/4 (50%)	7/7 (100%)
MUM1+**	58/117 (49%)	18/31 (58%)	0/3	1/5 (20%)	2/7 (29%)
BCL2+*	56/110 (51%)	20/26 (77%)	1/3 (33%)	2/5 (40%)	7/7 (100%)
MYC overexpression					
Quantitative assessment*	43/104 (41%)	15/32 (47%)	2/2 (100%)	5/5 (100%)	6/7 (86%)
Median (range)	13.3 (0.05-72)	14.3 (0.3-62.8)	13.7 (12.3-15)	56.9 (29.8-82)	37.6 (4.3-80)

MYC negative: MYC with no alterations; MYC-SH: MYC single hit; MYC-DH/TH: double and triple hit; BCLU: B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between DLBCL and BL. *P<0.05; **P<0.05 considering MYC vs. MYC gained vs. MYC amplified and/or rearranged (SH and DH).

Table 4. Clinical features and survival of patients according to MYC alterations.

	MYC negative	MYC gained	MYC amplified	MYC-SH	MYC-DH/TH
Age \geq 60 years	69/125 (55%)	19/34 (56%)	2/3 (67%)	4/5 (80%)	4/7 (57%)
Gender (male:female)	65:62	22:12	2:1	2:3	7:0
Extranodal	44/114 (39%)	8/21 (38%)	2/3 (67%)	3/4 (75%)	2/7 (29%)
Stage III-IV	74/124 (60%)	20/31 (65%)	3/3 (100%)	4/5 (80%)	4/6 (67%)
Elevated LDH	62/116 (53%)	12/26 (46%)	2/3 (67%)	4/5 (80%)	4/5 (80%)
IPI-III/IV high**	53/121 (44%)	14/29 (48%)	2/3 (67%)	3/4 (75%)	5/6 (83%)
Complete response [†]	84/110 (76%)	20/32 (63%)	1/3 (33%)	2/5 (40%)	4/5 (80%)
Median overall survival (years)**	NR	9.7	1.1	1.4	1.7
Median orignression-free survival (years)* [‡]	8.9	4.1	1.1	0.8	1.7

MYC negative: MYC with no alterations; MYC-SH: MYC single hit; MYC-DH/TH: double and triple hit; NR: not reached. * $P < 0.05$; ** $P < 0.05$ MYC- and MYC gained vs. MYC amplified and/or rearranged (SH and DH) [†]The analysis of response, progression-free survival and overall survival was limited to the 196 patients treated with adriamycin-containing immunotherapy with curative intention.

Cases with MYC rearrangements or amplifications had MYC overexpression more frequently than the remaining cases (13/14 versus 58/136; $P < 0.005$; Table 3). Ten of 12 cases with MYC breaks had at least 30% or more positive cells, whereas only two cases expressed MYC protein in 19% and 4% of the neoplastic cells. The mean percentage of cells expressing MYC in the former cases was 53% (range, 30-82%). Among cases with amplifications or gains of MYC gene, MYC protein expression was observed in an average of 14% of cells in each group (range, 12- 15% for amplifications and 0-63% for gains). However, there were cases with no MYC gene alterations that had high expression of MYC protein. Thus, 20/104 (19%) MYC-negative cases and 6/32 (19%) MYC-gained cases had more than 30% positive cells expressing MYC protein (*Online Supplementary Table S4*).

Rearrangements of BCL2 were as common as gains of the gene (15%). A significant correlation was observed between gene alteration and protein expression: 91% cases with rearranged BCL2 and 69% with gains/amplifications had high expression of BCL2 ($P < 0.005$). Among BCL2-translocated cases 19/26 (73%) were CD10-positive ($P < 0.005$). BCL6 was more commonly rearranged than gained or amplified (28%, 13% and 2%, respectively). BCL6 protein was expressed in 91% of translocated cases and 74% of gained and amplified tumors ($P < 0.005$). Gains were the most common gene alterations detected for MALT1. Notably, 28/36 (78%) cases with gains or amplification of BCL2 also presented gains or amplifications of MALT1.

Clinical impact of MYC genetic alterations and MYC expression

The correlations of MYC genetic abnormalities and the main clinical data are detailed in Table 4. Patients with MYC rearrangements or amplifications more frequently had high/intermediate- or high-risk IPI scores than the other patients (77% versus 46%; $P = 0.03$). The initial clinical features of patients with MYC gains were completely similar to those with no MYC alterations. Table 5 shows the clinico-pathological features of the patients according to MYC expression. Patients with MYC overexpression were more frequently older and more frequently had advanced stage disease, high serum lactate dehydrogenase (LDH) concentration and high-risk IPI score. *Online Supplementary Tables S2 and S3* and *Online Supplementary Figure S3* show the results considering the 40% cut-off for

Table 4. Main clinico-pathological data according to MYC expression.

	MYC negative (n=87)	MYC positive (n=81)
Immunohistochemistry		
CD10+	23/83 (28%)	24/77 (31%)
BCL6+ *	46/82 (56%)	55/74 (74%)
MUM1+	38/60 (63%)	39/71 (55%)
BCL2+	40/72 (56%)	37/64 (58%)
FISH		
BCL2 alterations	28/77 (36%)	28/72 (39%)
BCL6 alterations	29/75 (39%)	33/68 (49%)
MALT1 alterations	15/76 (20%)	15/67 (22%)
Clinical data		
Age \geq 60 years *	42/85 (49%)	57/81 (70%)
Gender (male:female)	48:39	45:36
Extranodal	23/71 (32%)	28/70 (40%)
Stage III-IV *	46/82 (56%)	57/81 (70%)
Elevated LDH *	33/75 (44%)	52/75 (69%)
IPI-III/IV high *	29/79 (37%)	50/77 (65%)
Complete response *	59/82 (72%)	48/77 (62%)
Median overall survival (years) *	9.67	6.0
Median progression-free survival (years) *	NR	4.3

* $P < 0.05$; NR: not reached.

MYC expression.

Genetic alterations or MYC expression were not taken into consideration to decide the patients' therapy. Among the 196 patients treated with curative intention, the median progression-free and overall survival were 7.5 and 9.7 years, respectively. All the following results refer to these patients.

Progression-free survival according to MYC genetic alterations is detailed in Table 4 and plotted in Figure 2A. The 5-year progression-free survival rates for patients with no alterations, MYC gains, and MYC rearrangements were 65%, 41%, and 15 %, respectively ($P = 0.003$). In addition, 5-year progression-free survival rates according to MYC protein expression were 65% and 49% for negative versus positive cases, respectively ($P = 0.003$), as shown in Figure 2C. Other variables predicting poor progression-free survival were advanced stage, age > 60 years, high serum LDH, and intermediate/high or high IPI score ($P < 0.05$ in all cases). In the multivariate analysis, including MYC gene status, MYC protein expression and IPI, the Cox model with 141 cases showed that IPI (relative risk:

1.5; $P < 0.001$) was the only variable predicting progression-free survival.

Overall survival according to *MYC* genetic alterations is shown in Table 4 and plotted in Figure 2B. Five-year overall survival rates for patients with no alterations, *MYC* gains, and *MYC* rearrangements were 69%, 59%, and 31%, respectively ($P = 0.021$). Of note, no differences were found in overall survival rates between patients who were *MYC* negative and those with *MYC* gains. Moreover, 5-year overall survival rates according to *MYC* protein expression were 75% and 52% for negative *versus* positive cases, respectively ($P < 0.001$), as shown in Figure 2D. Other variables predicting overall survival were stage, age, serum LDH and IPI ($P < 0.05$ in all cases). In the multivariate analysis, including *MYC* gene status, *MYC* expression and IPI, the Cox model with 141 cases showed that IPI (relative risk: 1.5; $P = 0.001$) and *MYC* protein expression (relative risk: 1.95; $P = 0.023$) were the most important variables for predicting overall survival.

MYC protein expression was analyzed along with the presence of *MYC* genetic alterations. Figures 2E and 2F show the progression-free and overall survival curves according to the combination of *MYC* gene alterations and *MYC* expression. We observed that the presence of *MYC* protein expression had an unfavorable impact on both progression-free survival and overall survival ($P = 0.007$) (Figure 2E and 2F, respectively).

Clinical impact of *BCL2*, *BCL6* and *MALT1* genetic alterations and protein expression

Genetic changes involving *BCL2*, *BCL6* and *MALT1*, as well as *BCL6* protein expression did not influence the out-

come of the patients (*data not shown*). With regards to *BCL2*, patients with tumors expressing *BCL2* had shorter progression-free survival and overall survival than those who were *BCL2*-negative (5-year progression-free survival 49% *versus* 69%, respectively; $P = 0.009$ and 5-year overall survival: 57% *versus* 73%, respectively; $P = 0.09$).

The impact of *MYC* and *BCL2* expression was also evaluated in the present series, since recent studies have shown a remarkable impact of the expression of both proteins on the outcome of patients with DLBCL.^{10,12,24} Figures 3A and 3B illustrate the progression-free and overall survival curves plotted according to the different combinations of *MYC* and *BCL2* protein expression. As can be seen, patients with tumors positive for both *MYC* and *BCL2* had the worst outcome, whereas those with double-negative tumors had the best outcome. Isolated *BCL2* or *MYC* expression conferred intermediate prognosis. A multivariate analysis was performed including *BCL2* and *MYC* expression as co-variables. Both *BCL2* (HR: 2.1; $P = 0.009$) and *MYC* (HR: 2.1; $P = 0.009$) maintained prognostic importance for progression-free survival in a model with 120 cases, whereas only *MYC* expression (HR: 3.0; $P < 0.001$) showed a prognostic impact on overall survival. Finally, when *BCL2* expression was included in the multivariate analyses for progression-free survival and overall survival along with the main clinico-pathological variables, it did not reach independent prognostic value.

Discussion

In this study we analyzed the clinical impact of *MYC*

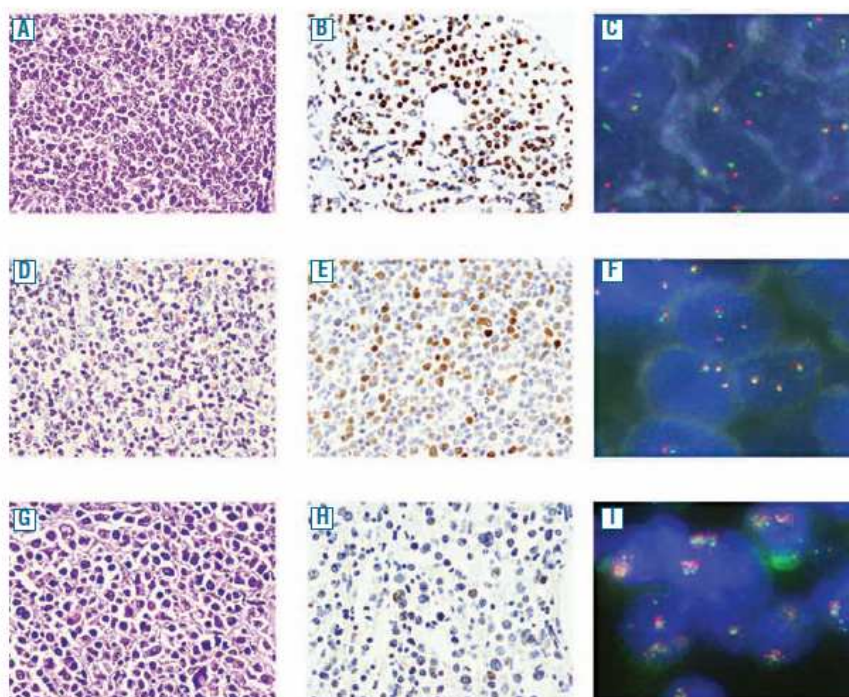


Figure 1. Hematoxylin-eosin stain (x400), *MYC* immunohistochemistry (x400) and FISH in DLBCL cases (x1000). DLBCL with *MYC* protein expression in 82% of tumor cells and *MYC* rearrangements (1A-1C); *MYC* expression in 33% of cells in a case with *MYC* gains (1D-1F); *MYC* expression in 15% of tumor cells and *MYC* amplifications (1G-1I).

genetic alterations and protein expression in a large cohort of patients with DLBCL treated with immunochemotherapy. Since MYC dysregulation can occur by different mechanisms, our study focused on the analysis of both gene alterations and protein expression, and their influence on the clinical behavior of the tumors. Using FISH we observed that changes involving MYC, as well as those of *BCL2*, *BCL6* and *MALT1*, were events occurring in most tumor cells, independently of the type of alteration. MYC

alterations occurred either at gene or protein level in 41% cases (18 and 43%, respectively). The incidence of the genetic changes is similar to that found in other series in which the same methods of detection were used.^{7,9,10,35,36} The relative higher number of cases overexpressing MYC protein in our study is due to the computerized method used to quantify the expression and the different cut-off obtained using a statistical method.²⁸ With this approach we obtained the most significant cut-off value at 10%.

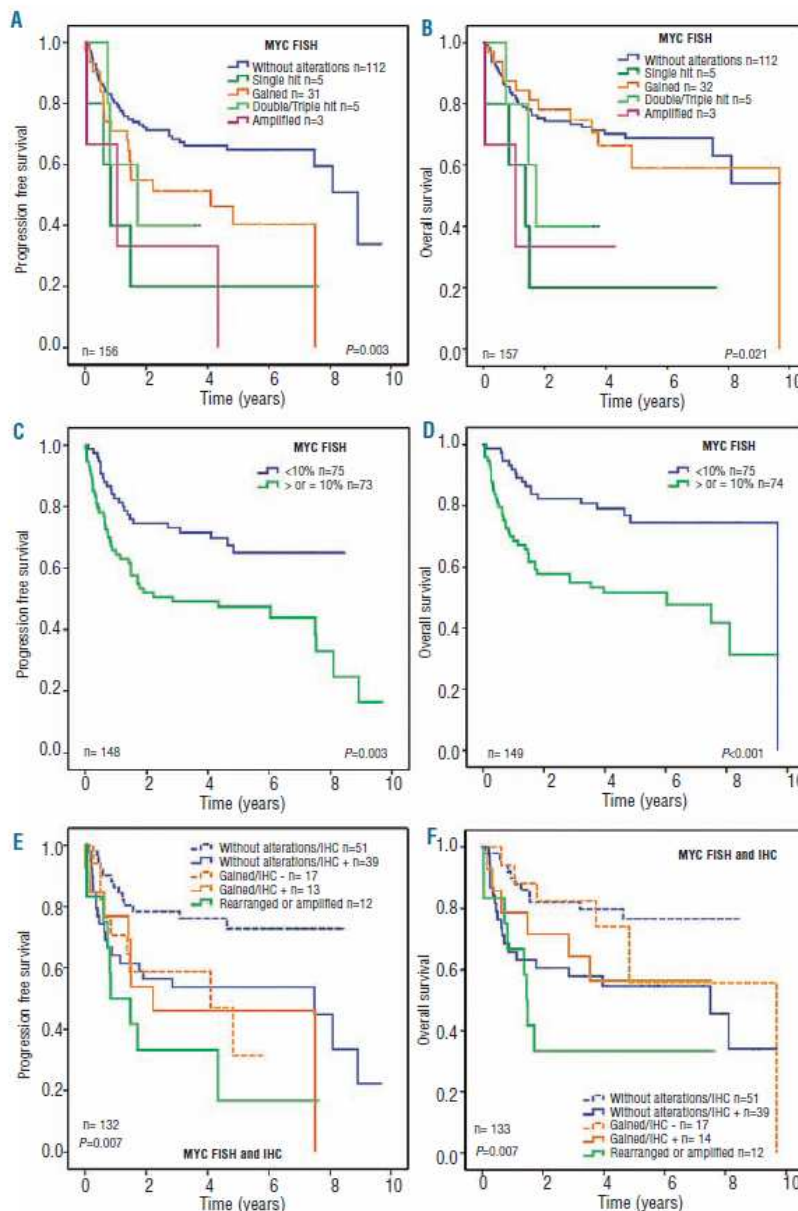


Figure 2. Kaplan-Meier analysis of *de novo* DLBCL patients treated with immunochemotherapy with curative intent in different settings. (A) Progression-free survival (PFS) and (B) Overall survival (OS) according to MYC gene alterations as assessed by FISH. (C) PFS and (D) OS of patients according to MYC expression as assessed by quantitative immunohistochemistry (IHC); a threshold of 10% was obtained by the Maxstat test. (E) PFS and (F) OS of patients according to MYC gene alterations and MYC expression.

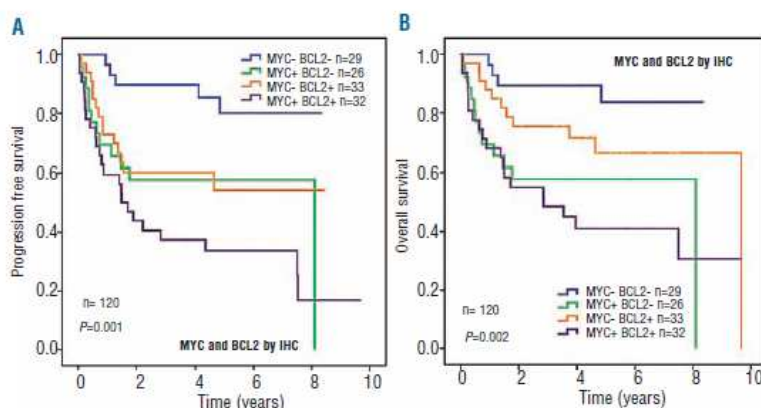


Figure 3. Progression-free survival (A) and overall survival (B) of cases grouped according to MYC and BCL2 expression.

Recent studies have focused on the significance of *MYC* rearrangements in DLBCL, but there is very little information regarding the clinical impact of gains and amplifications in series of patients homogeneously treated with regimens including immunotherapy. In our study the incidence of gains and amplifications was 19% and 2%, respectively. Patients with *MYC* gains had similar clinical features as those with no detectable *MYC* alterations. Gains were usually associated with additional genetic alterations in the other genes studied and only 13% cases had *MYC* gains as the unique alteration. Two previous studies have evaluated the impact of gains of *MYC* gene in DLBCL. Testoni *et al.* studied 166 patients treated with R-CHOP by array comparative genetic hybridization and found that cases with gains had additional alterations and expressed high levels of *MYC* mRNA. *MYC* gains only had an impact on overall survival when they were associated with deletions of 8p.²⁷ Yoon *et al.* studied 156 patients and observed that cases with increased copy number and translocations had a shorter survival. However, in that study only 23 of 129 patients with available follow-up were treated with immunochemotherapy. Moreover, in the same study cases with gains were analyzed along with the cases with *MYC* amplification.²⁸ In our study we considered the presence of three or four copies as gains, and more than four gene copies as amplifications; with this approach we identified a small group of patients with *MYC* amplifications who had a very unfavorable outcome similar to that of double/triple-hit DLBCL. Mossafa *et al.* also reported that *MYC* amplification was an unfavorable alteration in a group of patients with high-grade B-lymphomas, including 12 with transformed low-grade B-cell lymphomas and three DLBCL.³¹

MYC rearrangements have been detected in 6 to 14% of *de novo* DLBCL. In our study, 12 (7%) cases showed *MYC* rearrangement and 7/12 (58%) had additional rearrangements of *BCL2* and/or *BCL6*. This is consistent with previous FISH studies showing that 40-80% of DLBCL with *MYC* rearrangements have concurrent *BCL2* and/or *BCL6* translocations, and also with conventional genetic studies indicating that *MYC* genetic alterations are usually associated with additional chromosomal changes in these tumors.⁵ Recent studies have shown a dismal prognosis for double/triple-hit DLBCL, even in patients treated with immunochemotherapy. However, only a small number of

these studies analyzed the impact of concurrent double/triple-hit compared to *MYC* single-hit cases. Green *et al.* studied a series of 191 DLBCL by FISH for *MYC* and *BCL2*, as well as the protein expression of these markers by immunohistochemistry.⁹ After excluding concurrent double-hit lymphomas, they did not find that *MYC* gene breaks had a significant impact on the survival of their patients. Similarly, Johnson *et al.* observed a very unfavorable impact of *MYC* rearrangements only when they were associated with either *BCL2* breaks or protein overexpression.¹² In our series the behavior of single-hit *MYC* and double/triple-hit was similar. These findings suggest that single-hit *MYC* should not be underestimated, particularly when associated with high protein expression. It seems clear that *BCL2* and/or *BCL6* breaks confer a very unfavorable behavior to *MYC* rearrangements. The differences between studies may be due to the very low number of cases showing single-hit *MYC*. Further studies are needed to clarify the prognostic value of single-hit *MYC*.

MYC protein expression was detected in 81/168 (48%) of cases. In our series a high average of cells (over 30%) with *MYC* protein expression was observed in 83% of tumors with *MYC* rearrangement, 19% of cases with *MYC* gains and in 19% of cases with no *MYC* gene alterations. Thus, the presence of *MYC* rearrangement correlated with *MYC* protein expression in this series and our results were similar to those of other studies using the same antibody.^{24,25} The *MYC* protein expression studies also identified a subset of tumors with levels of expression over 30% without gene alterations (19%) indicating that mechanisms other than gene alterations may cause overexpression of the protein.^{10,20,24,25}

We observed that high *MYC* protein expression had an unfavorable prognostic impact in patients with DLBCL. Maximally selected log-rank statistics were applied for *MYC* protein expression to determine the most appropriate cut-off values capable of separating two subgroups with different survival distributions. Establishing the most appropriate cut-off is of critical importance for the translation of new biomarkers into the clinical practice, and this approach has been found to be useful by us and other groups in the identification of the most suitable cut-off points for markers as prognosticators.³⁸⁻⁴¹ The threshold that best captured the unfavorable impact of *MYC* alter-

ations in our series was 10%. Using a digitally determined cut-off of 40% and an observational cut-off of 25% MYC alterations still had a significant prognostic impact on overall survival but not on progression-free survival. Moreover, high MYC protein expression but not the genetic alteration maintained the prognostic impact on survival in the multivariate analysis, together with the IPI, when the cut-off value was 10%, but not the 40% by digital analysis or the 25% by the manual approach (*Online Supplementary Table S2*). Three recent studies evaluated the impact of MYC protein expression in patients with DLBCL treated with R-CHOP. Notably, a cut-off of 40% was coincidentally used in all, and only in the study of by Horn *et al.* did MYC protein expression have a significant prognostic impact in the univariate survival analyses.^{9,10,12} The impact of MYC and BCL2 coexpression was also evaluated in these studies. Green *et al.* and Horn *et al.* described scores predicting outcome and observed that patients with MYC/BCL2⁺ scores had an unfavorable prognosis.^{9,10} Johnson *et al.* found that patients with simultaneous expression of both markers had inferior overall and progression-free survival.¹² We performed the same analysis and obtained similar results, emphasizing the impact of MYC and BCL2 proteins in DLBCL. Notably, none of the previous studies used the same cut-off value for BCL2. Differently from these studies, in our study MYC-positive cases with no BCL2 overexpression retained an unfavorable prognosis. This difference may be attributed to the different cut-offs used for BCL2 in the four studies, and the different threshold for MYC in ours, in addition to the different methodological approaches used to evaluate MYC and BCL2. During the process of the review of our paper a new study reinforcing the unfa-

vorable impact of MYC⁺/BCL2⁺ cases has been pre-published.⁴²

In summary, in this study we have shown the prognostic impact of MYC gene rearrangements, amplifications and protein overexpression in DLBCL, particularly when these alterations are associated with BCL2/BCL6 rearrangements or BCL2 protein overexpression. The immunohistochemical detection of MYC protein may be a screening method to identify a subgroup of DLBCL patients with poor prognosis. However, further studies with larger cohorts of patients are needed to clarify whether the immunohistochemical detection may substitute the genetic analysis of MYC, BCL2 and BCL6 for the identification of "double-hit" genetic tumors.

Acknowledgments

The authors would like to thank Elena Gonzalvo, Ingrid Victoria, Mònica Marina and Laura Gelabert for their excellent technical assistance.

Funding

This study was supported by "Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología Española" (CICYT SAF08/3630, Red Temática de Investigación Cooperativa del Cáncer (RTICC) (RD06/0020/0039), RD12/0036/0023, and Fondo de Investigación Sanitaria (PI12/01536), Spanish Ministry of Health, and grant "Feno/genotipatge DLBCL", La Caixa.

Authorship and Disclosures

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

References

1. Campo E, Swerdlow SH, Harris NL, Pileri S, Stein H, Jaffe ES. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood*. 2011;117(19):5019-32.
2. Jaffe ES, Pitaluga S. Aggressive B-cell lymphomas: a review of new and old entities in the WHO classification. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2011; 2011:506-14.
3. Slack GW, Gascoyne RD. MYC and aggressive B-cell lymphomas. *Adv Anat Pathol*. 2011;18(3):219-28.
4. Aukema SM, Siebert R, Schuuring E, van Imhoff CW, Kluijn-Nelemans HC, Boerma EJ, et al. Double-hit B-cell lymphomas. *Blood*. 2011;117(8):2319-31.
5. Salaverria I, Siebert R. The gray zone between Burkitt's lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma from a genetics perspective. *J Clin Oncol*. 2011;29(14):1835-43.
6. Snuderl M, Kolman OK, Chen YB, Hsu JJ, Ackerman AM, Dal CP, et al. B-cell lymphomas with concurrent IGH-BCL2 and MYC rearrangements are aggressive neoplasms with clinical and pathologic features distinct from Burkitt lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Surg Pathol*. 2010;34(3):327-40.
7. Akyurek N, Uner A, Benekli M, Barista I. Prognostic significance of MYC, BCL2, and BCL6 rearrangements in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone plus rituximab. *Cancer*. 2012;118(17):4173-83.
8. Barrans S, Crouch S, Smith A, Turner K, Owen R, Patmore R, et al. Rearrangement of MYC is associated with poor prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated in the era of rituximab. *J Clin Oncol*. 2010;28(20):3360-5.
9. Green TM, Young KH, Visco C, Xu-Monette ZY, Orazi A, Go RS, et al. Immunohistochemical double-hit score is a strong predictor of outcome in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone. *J Clin Oncol*. 2012;30(28):3460-7.
10. Horn H, Ziepert M, Becher C, Barth TF, Bernd HW, Feller AC, et al. MYC status in concert with BCL2 and BCL6 expression predicts outcome in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 2013;121(12):2253-63.
11. Hummel M, Bentink S, Berger H, Klapper W, Wessendorf S, Barth TF, et al. A biologic definition of Burkitt's lymphoma from transcriptional and genomic profiling. *N Engl J Med*. 2006;354(23):2419-30.
12. Johnson NA, Slack GW, Savage KJ, Connors JM, Ben-Neriah S, Rogic S, et al. Concurrent expression of MYC and BCL2 in diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone. *J Clin Oncol*. 2012;30(28):3452-9.
13. Klapper W, Stoecklein H, Zeynalova S, Ott C, Kosari F, Rosenwald A, et al. 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):2226-9.
14. Nitsu N, Okamoto M, Miura I, Hirano M. Clinical significance of 8q24/c-MYC translocation in diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer Sci*. 2009;100(2):233-7.
15. Savage KJ, Johnson NA, Ben-Neriah S, Connors JM, Sehn LH, Farinha P, et al. MYC gene rearrangements are associated with a poor prognosis in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with R-CHOP chemotherapy. *Blood*. 2009;114(17):3533-37.
16. Lenz G, Wright G, Dave SS, Xiao W, Powell J, Zhao H, et al. Stromal gene signatures in large-B-cell lymphomas. *N Engl J Med*. 2008;359(22):2313-23.
17. Ziepert M, Hasenclever D, Kuhnt E, Glass B, Schmitz N, Pfreundschuh M, et al. Standard International prognostic index remains a valid predictor of outcome for patients with aggressive CD20+ B-cell lymphoma in the rituximab era. *J Clin Oncol*. 2010;28(14):2373-80.
18. Gutierrez-García G, Cardesa-Salzmänn T, Climent F, Gonzalez-Barca E, Mercadal S, Mate JL, et al. Gene-expression profiling and not immunophenotypic algorithms predicts prognosis in patients with diffuse

- large B-cell lymphoma treated with immunochemotherapy. *Blood*. 2011;117(18):4836-43.
19. Dave SS, Fu K, Wright GW, Lam LT, Kluin P, Boerma EJ, et al. Molecular diagnosis of Burkitt's lymphoma. *N Engl J Med*. 2006;354(23):2431-42.
 20. Kluk MJ, Chapuy B, Sinha P, Roy A, Dal CP, Neuberg DS et al. Immunohistochemical detection of MYC-driven diffuse large B-cell lymphomas. *PLoS One*. 2012;7(4):e33813.
 21. Schrader A, Benink S, Spang R, Lenze D, Hummel M, Kuo M, et al. High Myc activity is an independent negative prognostic factor for diffuse large B cell lymphomas. *Int J Cancer*. 2012;131(4):E348-61.
 22. Stasiak CJ, Nitta H, Zhang W, Mosher CH, Cook JR, Tubbs RR, et al. Increased MYC gene copy number correlates with increased mRNA levels in diffuse large B-cell lymphoma. *Haematologica*. 2010;95(4):597-603.
 23. Yoon SO, Jeon YK, Paik JH, Kim WY, Kim YA, Kim JE, et al. 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):205-17.
 24. Green TM, Nielsen O, de SK, Xu-Monette ZY, Young KH, Moller MB. High levels of nuclear MYC protein predict the presence of MYC rearrangement in diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Surg Pathol*. 2012;36(4):612-9.
 25. Tapia G, Lopez R, Munoz-Marmol AM, Mate JL, Sanz C, Marginet R, et al. Immunohistochemical detection of MYC protein correlates with MYC gene status in aggressive B cell lymphomas. *Histopathology*. 2011;59(4):672-8.
 26. Colomo L, Lopez-Guillermo A, Perales M, Rives S, Martinez A, Bosch F, et al. Clinical impact of the differentiation profile assessed by immunophenotyping in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 2003;101(1):78-84.
 27. de JD, Xie W, Rosenwald A, Chhanabhai M, Gaulard P, Klapper W, et al. Immunohistochemical prognostic markers in diffuse large B-cell lymphoma: validation of tissue microarray as a prerequisite for broad clinical applications (a study from the Lunenburg Lymphoma Biomarker Consortium). *J Clin Pathol*. 2009;62(2):128-38.
 28. Hothorn T, Lausen B. On the exact distribution of maximally selected rank statistics. *Computational Statistics & Data Analysis*. 2003;49(2):121-37.
 29. Valera A, Balague O, Colomo L, Martinez A, Delabie J, Taddesse-Heath L, et al. IG/MYC rearrangements are the main cytogenetic alteration in plasmablastic lymphomas. *Am J Surg Pathol*. 2010;34(11):1686-94.
 30. Ventura RA, Martin-Subero JI, Jones M, McParland J, Gesk S, Mason DY, et al. FISH analysis for the detection of lymphoma-associated chromosomal abnormalities in routine paraffin-embedded tissue. *J Mol Diagn*. 2006;8(2):141-51.
 31. Mossafa H, Damotte D, Jenabian A, Delarue R, Vincenneau A, Amouroux I, et al. Non-Hodgkin's lymphomas with Burkitt-like cells are associated with c-Myc amplification and poor prognosis. *Leuk Lymphoma*. 2006;47(9):1885-93.
 32. Cheson BD, Pfistner B, Juweid ME, Gascoyne RD, Specht L, Horning SJ, et al. Revised response criteria for malignant lymphoma. *J Clin Oncol*. 2007;25(5):579-86.
 33. Kaplan EL, Meier P. Non-parametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc*. 1958;53:457-81.
 34. Cox D. Regression models and life tables. *J R Stat Assoc*. 1972;34:187-220.
 35. Copie-Bergman C, Gaulard P, Leroy K, Briere J, Baia M, Jais JE, et al. Immuno-fluorescence in situ hybridization index predicts survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP: a GELA study. *J Clin Oncol*. 2009;27(53):5573-9.
 36. Foot NJ, Dunn RC, Geoghegan H, Wilkins BS, Neat MJ. Fluorescence in situ hybridisation analysis of formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections in the diagnostic work-up of non-Burkitt high grade B-cell non-Hodgkin's lymphoma: a single centre's experience. *J Clin Pathol*. 2011;64(9):802-8.
 37. Testoni M, Kwee I, Greiner TC, Montes-Moreno S, Vose J, Chan WC, et al. Gains of MYC locus and outcome in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *Br J Haematol*. 2011;155(2):274-7.
 38. Bomben R, Dal BM, Zucchetto A, Zaina E, Nanni P, Sonogo F, et al. Mutational status of IgV(H) genes in B-cell chronic lymphocytic leukemia and prognosis: percent mutations or antigen-driven selection? *Leukemia*. 2005;19(8):1490-2.
 39. Gine E, Martinez A, Villamor N, Lopez-Guillermo A, Camos M, Martinez D, et al. Expanded and highly active proliferation centers identify a histological subtype of chronic lymphocytic leukemia ("accelerated" chronic lymphocytic leukemia) with aggressive clinical behavior. *Haematologica*. 2010;95(9):1526-33.
 40. Krober A, Seiler T, Benner A, Bullinger L, Brucke E, Licher P, et al. V(H) mutation status, CD38 expression level, genomic aberrations, and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2002;100(4):1410-6.
 41. Zucchetto A, Sonogo F, Degan M, Bomben R, Dal BM, Bulian P, et al. Surface-antigen expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia: from the signature of specific disease subsets to the identification of markers with prognostic relevance. *J Transl Med*. 2006;4:11.
 42. Hu S, Xu-Monette ZY, Tzankov A, Green T, Wu L, Balasubramanyam A, et al. MYC/BCL2 protein co-expression contributes to the inferior survival of activated B-cell subtype of diffuse large B-cell lymphoma and demonstrates high-risk gene expression signatures: a report from The International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program Study. *Blood*. 2013;121(20):4021-31; quiz 4250.

Online supplementary Methods

Case Selection

Two hundred and nineteen patients (125M/94F; median age, 61 years) consecutively diagnosed with *de novo* DLBCL between 2002 and 2007 were retrieved from the files of 5 institutions of the *Grup per l'Estudi dels Limfomes de Catalunya i Balears* (GELCAB) with the only criterion of the availability of adequate histological material. All the tumors were classified as DLBCL according to the current WHO classification. Patients with previous indolent lymphoma, immunodeficiency-associated lymphomas, post-transplant lymphoproliferative disorders, intravascular, central nervous system, primary effusion lymphomas and primary mediastinal lymphomas were excluded from the study. Patients with BL were also excluded. Formalin-fixed and paraffin-embedded tissue was available in all cases.

Morphology and immunohistochemistry

The diagnosis of DLBCL was based on the criteria established in the World Health Organization (WHO) classification, and the tumors were classified into the more common morphological variants. Immunohistochemical (IHC) studies were performed with a panel of monoclonal and polyclonal antibodies reactive in paraffin-embedded sections using a peroxidase-labeled detection system, standard antigen retrieval protocols, and automated immunostainers (Dako autostainer, Denmark; Bond-Max, Leica Microsystems, Germany). Tissue microarrays (TMAs) were constructed using a tissue arrayer (MTA I; Beecher Instruments) and included two 1-mm representative cores of each case. Standard methods for tissue fixation (10% buffered formalin) and processing were used in the participating centers. The panel of antibodies included common B and T-cell markers as well as CD10 (clone 56C6), MUM1/IRF4 (clone MUM1p), BCL2 (clone 124), and Ki-67 (clone MIB-1) all from Dako, and BCL6, kindly

provided by Dr. Roncador (Centro Nacional de Investigaciones Oncologicas, Madrid, Spain).

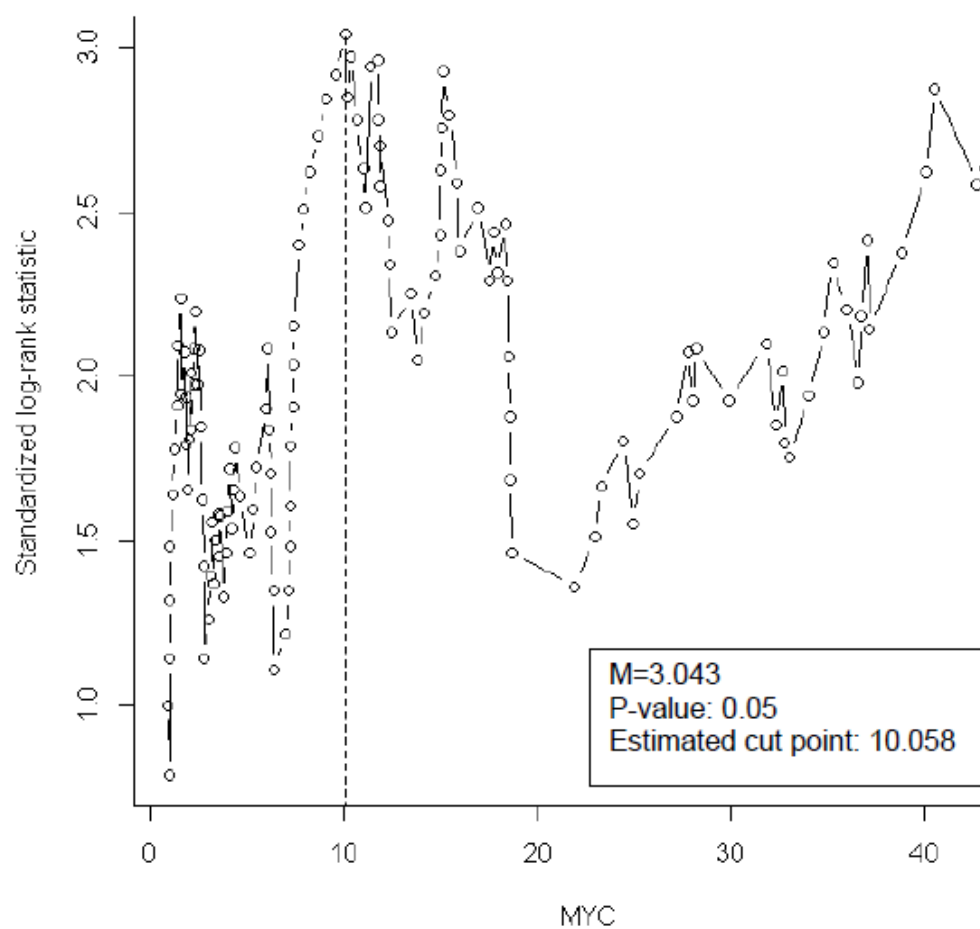
MYC antibody (clone Y69, Epitomics, USA) was used at dilution 1/40, with incubation of the primary antibody for 1 hour and antigen retrieval at pH 6 for 30 minutes. A MYC TMA that included tonsil sections, Burkitt lymphomas and Burkitt cell lines Raji and Namalwa was used as external control. MYC immunostaining was evaluated using a computerized image analysis method. Digitalized images were acquired with the ScanScope CS System at 20x magnification and then quantified using a nuclear algorithm with the Aperio ImageScope software version 9.0.0.1521 (Aperio Technologies, Vista, CA) in TMA sections. Cases with small biopsy samples and cores that dropped off of the TMAs were studied as whole-tissue sections, and a mean number of 7000 cells were evaluated per case (range 850-50000 cells).

We also evaluated MYC immunostaining in a semi-quantitative manner, and the samples were stratified into 5 groups based on the estimated percentage of positive cells: 1 ($\leq 10\%$ positive tumor cells), 2 (11-25%), 3 (26-50%), 4 (51-75%), 5 ($> 75\%$). With this approach the distribution of MYC expression was: group 1, 43 (25%); 2, 42 (25%); 3, 37 (22%); 4, 25 (15%), and 5, 23 (13%).

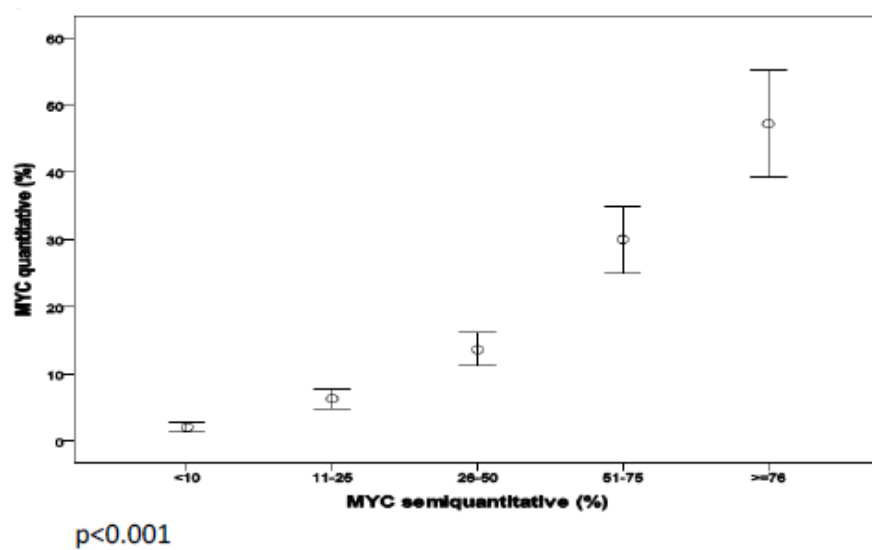
Fluorescence “In Situ” Hybridization (FISH)

FISH was done on 3 to 4 μm thick sections of TMA, using split signal DNA probes from Dako specific for the following loci: 18q21 (*BCL2*), 18q21 (*MALT1*), 3q27 (*BCL6*) and 8q24 (*MYC*). Tonsil sections were used as controls. For each tumor and tonsil sample a minimum of 100 evaluable nuclei were scored. The cut-off value used to detect rearrangements was 3%. Moreover, the mean number of numerical and structural genetic alterations was evaluated in each case, in order to assess the incidence of the genetic events in the tumors.

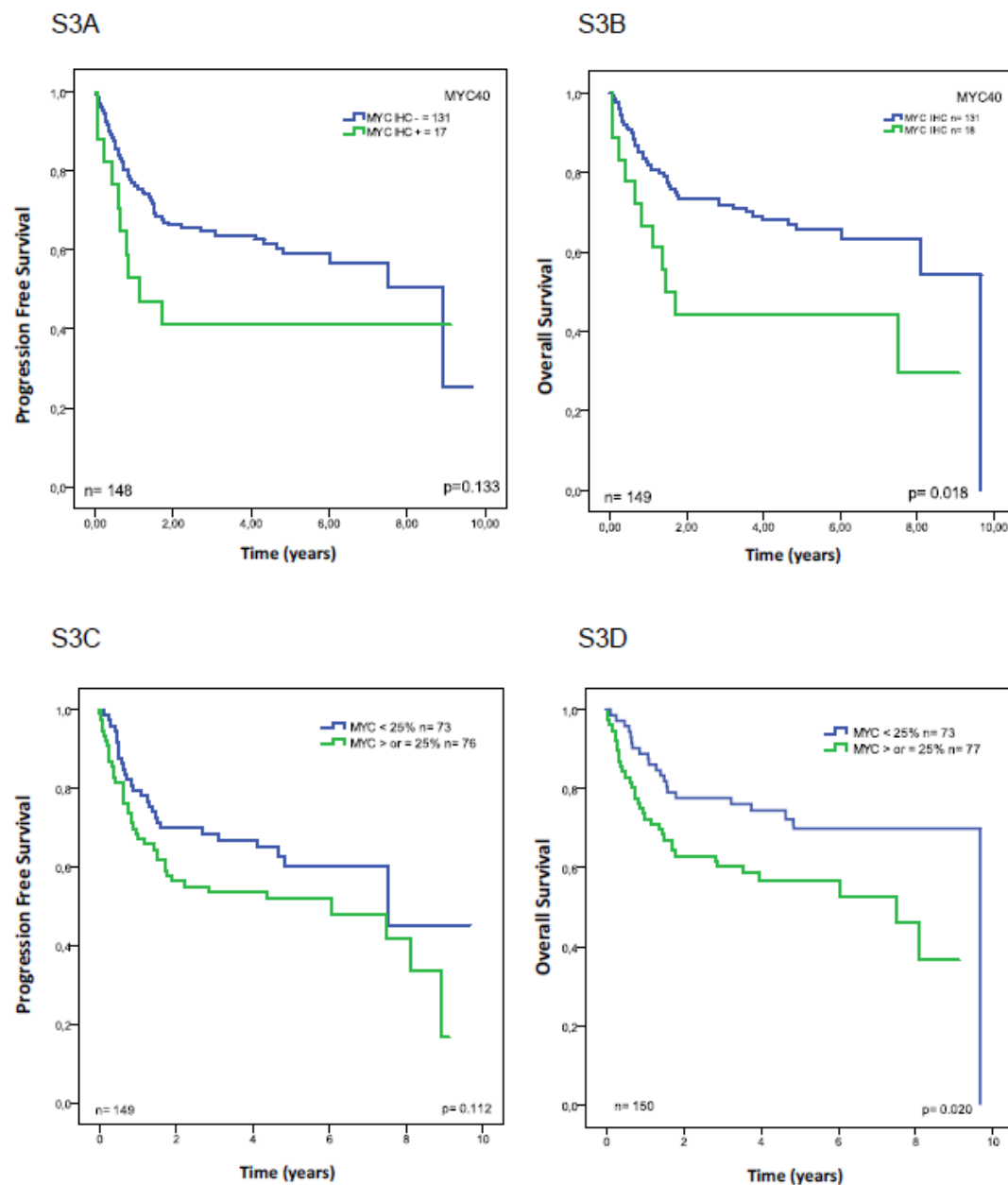
Supplementary Figure 1. Optimal cut-off of the quantitative MYC assessment for predicting survival (R statistical package, v. 2.8.1, Vienna, Austria; ref. 28)



Supplementary Figure 2. Correlation between computerized and semiquantitative methods evaluating of MYC protein expression



Supplementary Figure 3. Kaplan-Meier analysis of *de novo* DLBCL patients treated with immunochemotherapy with curative intention. A) Progression-free survival (PFS) and B) Overall survival (OS) according to MYC expression using a computerized method and a threshold of 40%; C) Progression-free survival (PFS) and D) Overall survival (OS) according to MYC expression using a manual method with a threshold of 25%



Supplementary Table 1: MYC gene and protein expression in cases with genetic alterations.

Cases	MYC gene	MYC protein
Rearranged		
1	15%	19%
2	79%	30%
3	80%	47%
4	80%	49%
5	90%	51%
6	90%	82%
7	93%	75%
8	> 95%	4%
9	>95%	30%
10	>95%	33%
11	>95%	80%
12	>95%	51%
Amplified		
1	91%	12%
2	97%	Not determined
3	>95%	15%

Supplementary Table 2: Main clinico-pathologic data according to the MYC expression using a cut-off of 40%

	MYC negative (n=144)	MYC positive (n=21)
Immunohistochemistry		
CD10+*	36/140 (26%)	11/20 (55%)
BCL6+	86/138 (62%)	15/18 (83%)
MUM1+	70/132 (53%)	7/19 (37%)
BCL2+	65/120 (54%)	12/16 (75%)
FISH		
<i>BCL2</i> alterations	48/131 (37%)	8/18 (44%)
<i>BCL6</i> alterations	55/127 (43%)	7/16 (44%)
<i>MALT1</i> alterations	28/126 (22%)	2/17 (12%)
Clinical data		
Age ≥ 60	83/145 (57%)	16/21 (76%)
Gender (M:F)	80:67	13:8
Extranodal*	40/123 (33%)	11/18 (61%)
Stage III-IV	87/142 (61%)	16/21 (76%)
Elevated LDH*	68/129 (53%)	17/21 (81%)
IPI-III/IV high*	63/137 (46%)	16/19 (84%)
Complete response	94/140 (67%)	13/19 (68%)
Median OS (years)*	9.67	1.46
Median PFS (years)	8.41	1.14

* $P < 0.050$

Supplementary Table 3: Summary of multivariate analyses according to the MYC expression using a cut-off of 10% or 40% obtained by a computerized method, and 25% obtained using a semi-quantitative approach.

	MYC 10% N=141		MYC 40% N=141		MYC 25% N=141	
	<i>P</i> value	Relative risk	<i>P</i> value	Relative risk	<i>P</i> value	Relative risk
Progression-free survival						
MYC gene status	NS	-	NS	-	NS	-
MYC expression	NS	-	NS	-	NS	-
IPI	<0.001	1.5	0.002	2.0	<0.001	3.9
Overall survival						
MYC gene status	NS	-	NS	-	NS	-
MYC expression	0.023	1.95	NS	-	NS	-
IPI	0.001	1.5	<0.001	2.2	<0.001	4.7

Treball 2

**Els reordenaments IG/MYC són la principal alteració citogenètica en
els limfomes plasmablàstics**

(American Journal of Surgical Pathology 2010; 34(11): 1686-1694)

Resum

El limfoma plasmablàstic (PBL) és un limfoma agressiu que està caracteritzat per un fenotip de cèl·lula B amb diferenciació terminal que normalment ocorre en pacients immunosuprimits o d'edat avançada. Tot i que les característiques clíniques i patològiques d'aquests tumors ja han estat definides, les alteracions genètiques implicades en la seva patogènesi no són ben conegudes. En aquest estudi, hem investigat les alteracions cromosòmiques dels gens *MYC*, *BCL2*, *BCL6*, *MALT1*, *PAX5* i *IGH* utilitzant hibridació in situ fluorescent en 42 PBLs i en 3 limfomes primaris de cavitats (PEL). El reordenament de *MYC* es va identificar en 20 de 41 (49%) PBLs i els gens de les *IGs* varen ser les seves parelles en els reordenaments de la majoria de tumors. El reordenament de *MYC* va ser més comú en els casos Epstein-Barr (EBV) positius (14 de 19, 74%) que els tumors EBV negatius (9 de 21, 43%) ($p < 0.05$). En cap PBL es van detectar reordenaments de *BCL2*, *BCL6*, *MALT1* o *PAX5* però guanys d'aquests gens es van observar entre un 31% a un 41% dels casos examinats. Dotze dels 40 PBLs on es va poder estudiar 3 o més gens, presentaven múltiples guanys simultanis en 3 o més. No es van trobar diferències a la supervivència dels pacients respecte *MYC* però els 4 pacients amb una supervivència més llarga (> 50 mesos) no tenien o presentaven un nombre baix de guanys (< 3). No es van trobar reordenaments de cap d'aquests gens en els PELs. En conclusió, els PBLs estan genèticament caracteritzats per freqüents translocacions *IG/MYC* i guanys en múltiples regions cromosòmiques. L'activació oncogènica de *MYC* en aquests limfomes podria ser un important element patogenètic associat amb la infecció per EBV.

IG/MYC Rearrangements are the Main Cytogenetic Alteration in Plasmablastic Lymphomas

Alexandra Valera, BSc,* Olga Balagué, MD,* Luis Colomo, MD,* Antonio Martínez, MD,* Jan Delabie, MD,† Lekidelu Tadesse-Heath, MD,‡ Elaine S. Jaffe, MD,§ and Elias Campo, MD*

Abstract: Plasmablastic lymphoma (PBL) is an aggressive lymphoma characterized by a terminally differentiated B-cell phenotype that usually occurs in the immunocompromised or elderly patients. Although the clinical and pathologic characteristics of these tumors have been defined, the genetic alterations involved in their pathogenesis are not well known. In this study, we have investigated the chromosomal alterations of *MYC*, *BCL2*, *BCL6*, *MALT1*, *PAX5*, and *IGH* loci using fluorescence in situ hybridization in 42 PBL and 3 extracavitary primary effusion lymphomas. *MYC* rearrangements were identified in 20 of 41 (49%) PBL and the immunoglobulin (*IG*) genes were the partners in most tumors. *MYC* rearrangements were more common in Epstein-Barr virus (EBV)-positive (14 of 19, 74%) than EBV-negative (9 of 21, 43%) tumors ($P < 0.05$). No rearrangements of *BCL2*, *BCL6*, *MALT1*, or *PAX5* were detected in any PBL but gains of these loci were observed in 31% to 41% of the cases examined. Twelve of the 40 PBL in which 3 or more loci could be investigated had multiple simultaneous gains in 3 or more loci. No differences in the survival of the patients according to *MYC* were observed but the 4 patients with the longest survival (> 50 mo) had no or low number of gains (< 3). No rearrangements of any of these loci were seen in the primary effusion lymphomas. In conclusion, PBL are genetically characterized by frequent *IG/MYC* translocations and gains in multiple chromosomal loci. The oncogenic

activation of *MYC* in these lymphomas may be an important pathogenetic element associated with EBV infection.

Key Words: plasmablastic lymphoma, *MYC*, FISH

(*Am J Surg Pathol* 2010;34:1686–1694)

Plasmablastic lymphoma (PBL) is an aggressive lymphoma, characterized by a diffuse proliferation of large B cells usually with immunoblastic morphology and the immunophenotype of a terminally differentiated B-cell with loss of mature B-cell markers and expression of plasma cell related antigens.³⁵ This tumor was initially recognized by Delecluse et al¹⁶ and proposed as a subtype of diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) presenting in the oral cavity of HIV-infected individuals. Subsequent studies have recognized that PBL may present in other locations, mainly extranodal sites, and in patients with other immunodeficiency conditions such as iatrogenic immunosuppression associated with posttransplant therapy or chronic treatments for autoimmune diseases and aging.^{14,33}

The clinical and pathologic features of PBL have been well defined, and this tumor is now recognized in the current WHO classification. It is distinguished from usual diffuse large B-cell lymphomas, NOS (DLBCL), and other forms of large B-lymphomas expressing a terminally B-cell differentiation phenotype such as ALK positive large B-cell lymphoma, primary effusion lymphoma, and large cell lymphoma arising in multicentric Castelman disease.³⁵ However, the genetic and molecular mechanisms that may be involved in the pathogenesis of PBL are not well known. One important element in the development of the tumor is the infection of the neoplastic cells by Epstein-Barr virus (EBV), which is present in most of the cases with a latency type I.^{14,16,17,21} Immunohistochemical studies have observed the lack of expression of the cell cycle inhibitors p27 and p16 and strong expression of p53 in a number of cases suggesting that inactivation of these genes may contribute to the high rate of proliferation commonly seen in the PBL.⁴⁰

Conventional and molecular cytogenetic studies have identified a number of primary and secondary chromosomal aberrations associated with many types of lymphoid neoplasms including large B-cell lymphomas,⁴ but the genetic alterations of PBL have not been fully

From the *Hematopathology Section, Laboratory of Pathology, Hospital Clínic, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), University of Barcelona, Barcelona, Spain; †Department of Pathology, Rikshospitalet-Radiumhospitalet HF, University of Oslo, Oslo, Norway; ‡Department of Pathology, Howard University Hospital, Washington, DC; and §Department of Pathology, National Cancer Institute, National Institutes of Health, Bethesda, MD.

This study was supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation SAF2008/3630, the Instituto de Salud Carlos III "Red Temática de Investigación Cooperativa de Cáncer" RD07/0020/2004, Asociación Española Contra el Cáncer AECC_07_011 and Instituto de Salud Carlos III, Fondo de Investigaciones Sanitarias PI080095.

No conflicts of interest were declared.

Correspondence: Luis Colomo, MD, Hematopathology Section, Hospital Clínic, Villarroel 170, 08036-Barcelona, Barcelona, Spain (e-mail: lcolomo@clinic.ub.es).

Supplemental Digital Content is available for this article. Direct URL citations appear in the printed text and are provided in the HTML and PDF versions of this article on the journal's Website, www.ajsp.com.

Copyright © 2010 by Lippincott Williams & Wilkins

TABLE 1. Clinical and Pathologic Features of Plasmablastic Lymphomas and Plasma Cell Neoplasms With Plasmablastic Features

	All PBL Cases (n = 42)	PBL Monomorphic (n = 28)	PBL Plasmacytic Differentiation (n = 14)	PEL (n = 3)
Age (range)	48 (11-86)	47 (11-86)	49 (35-82)	56 (49-62)
Sex (M:F)	33:8	22:6	11:2	3:0
Immunodeficiency				
HIV +	27/37 (73%)	20/26 (77%)	8/11 (72%)	3/3 (100%)
Other	2/37 (5%)	1/26 (4%)*	1/11 (9%)†	0/3
Location				
Nodal	12/42 (29%)	6/28 (21%)	6/14 (43%)	3/3 (100%)‡
Extranodal	30/42 (71%)	22/28 (79%)	8/14 (57%)	0
Oral & URT	11/30 (37%)	8/22 (36%)	3/8 (38%)	0
GI tract	6/30 (20%)	5/22 (23%)	1/8 (13%)	0
Skin	3/30 (10%)	3/22 (14%)	0	0
Soft tissues	6/30 (20%)	3/22 (14%)	3/8 (38%)	0
Other	4/30 (13%)	3/22 (14%)	1/8 (13%)	0
IHC				
CD20 +	0/39	0/25	0/14	1/3 (33%)
CD79a +	14/32 (66%)§	8/21 (67%)§	6/14 (50%)§	1/3 (33%)
PAX5 +	1/38 (3%)	1/26 (4%)	0/13	0/3
MUM1 +	20/20 (100%)	16/16 (100%)	4/4	1/1
CD138 +	26/32 (81%)	17/22 (77%)	9/10 (90%)	2/3 (67%)
CD56 +	7/37 (19%)	2/23 (9%)	5/14 (36%)	0/3
Viral status				
EBER +	24/41 (59%)	17/27 (63%)	7/14 (50%)	2/3 (67%)
LMP1 +	2/31 (6%)	2/22 (9%)	0/9	0/3
EBNA2 +	0/18	0/14	0/4	—
HHV8 +	0/27	0/16	0/11	3/3

*Crohn disease.

†Kidney transplant.

‡1 case had simultaneous ascites.

§Seven additional cases had weak and focal expression.

||Weak expression.

G.I. indicates gastrointestinal tract; PBL, plasmablastic lymphoma; PEL, primary effusion lymphoma; URT, upper respiratory tract mucosa.

explored. Some studies have identified complex karyotypes including the presence of *MYC* rearrangements in occasional cases. However, these reports have included only isolated cases or small series of tumors.^{7,13,15,36} Thus, the goal of this study was to more fully characterize the cytogenetic alterations that may be involved in the pathogenesis of PBL. We have investigated a large series of these tumors by fluorescence in situ hybridization (FISH) using probes covering genes and chromosomal regions frequently altered in the aggressive B-cell lymphomas.

MATERIALS AND METHODS

Case Selection

Forty-two cases of PBL were retrieved from the files of the laboratories of Pathology of the Hospital Clinic of Barcelona, Spain, National Cancer Institute, Bethesda, MD, Howard University Hospital of Washington, DC, and Rikshospitalet-Radiumhospitalet Medical Center of Oslo, Norway. The 2 cases from Howard University were earlier published in part.^{7,13,15,36} All the tumors were classified as PBL according to the WHO classification³⁵ and further typified as PBL, monomorphic or "oral type," and PBL with plasmacytic differentiation as earlier described.¹⁴ We also included in the study 3 extracavitary primary effusion lymphomas (PEL).¹² Formalin-fixed and

paraffin-embedded tissue was available in all the cases. Clinical information, including earlier medical history, clinical presentation, and follow-up of the patients, was obtained to the extent possible from the referring pathologists and clinicians (Table 1).

Immunohistochemistry and In Situ Hybridization

Immunohistochemical studies were carried out with a panel of monoclonal and polyclonal antibodies reactive in paraffin-embedded tissue sections using a peroxidase-labeled detection system, standard antigen retrieval protocols, and an automated immunostainer (Ventana Medical System, Tucson, AZ or Dako Autostainer, Dako, Copenhagen, Denmark), as earlier described.¹⁴ The panel of antibodies used included common B-cell markers such as CD20 (clone L26), CD79a (clone JCB117) and PAX5 (clone 24), MUM1/IRF4 (clone MUM1p), CD138 (clones MI15, 5F-7, B-A38), and CD56 (clones 123C3, NCF-CD56-1B6), from DAKO and Ventana suppliers.

The presence of the EBV genome was examined by in situ hybridization (ISH) to detect EBV-encoded early nuclear RNAs (EBER1 and EBER2) as earlier described.³ The EBV antigens LMP-1 and EBNA-2 were examined by immunohistochemistry using the CS1-4 (Dako) and NCL-EBV-Pe2 (Novocastra) antibodies, respectively. The antigen of latency (LANA-1) of HHV-8 was also studied by

immunohistochemistry using the clone LN53 (Advanced Biotechnologies).

Conventional Cytogenetics

Conventional cytogenetics was available in 3 cases, 2 of them (cases 33 and 36) earlier published, and the studies were carried out as described.³⁶

Fluorescence “In Situ” Hybridization (FISH)

FISH was done on 3 to 4- μ m thick sections of formalin-fixed paraffin-embedded tissues, using split-signal DNA probes (Dako) specific for these loci: 8q24 (*MYC*), 18q21 (*BCL2*), 18q21 (*MALT1*), 9p13 (*PAX5*), 3q27 (*BCL6*), and 14q32 (*IGH*). In the cases with *MYC* rearrangements, we carried out additional studies with a dual color-dual fusion *MYC/IGH/CEP8* translocation probe (Abbott Molecular, Illinois).

The FISH technique was carried out according to the guidelines of the Euro-FISH project as earlier described (www.euro-fish.org).³⁹ In brief, a dewaxing step was followed by a pretreatment process at 95°C, digestion with pepsin, washes with wash buffer, and dehydration with gradual ethanol dilutions. For the split probes, the slides were air dried and 10 μ L of the probe was applied in every sample. For the fusion probe, a mix of 7 μ L of buffer solution, 2 μ L of distilled water, and 1 μ L of probe were used. Denaturation at 82°C for 5 minutes and incubation at 45°C overnight were carried out for the split probes. For the fusion probe, the denaturation step was 3 minutes at 90°C, and the incubation 37°C overnight. The slides were then transferred to a stringency buffer at 65°C, washed in buffer solution, dehydrated, air dried, and mounted with Fluorescent Mounting Medium containing DAPI (Dako). The slides were stored in the dark at 2°C to 8°C until read. An Olympus BX51 microscopy (Olympus, Tokyo, Japan) was used.

The cut-off values for the interphase FISH analyses were established according to the criteria of Ventura et al.⁴¹ Tonsil sections were used as controls, and for each sample 100 to 200 evaluable nuclei with complete FISH signals were scored. For the break-apart probes, the cut-off values were 3% for the detection of the rearrangements, and 6% to detect gains. For the dual fusion probe, we considered a cut-off of 11% for both structural and numeric abnormalities.

Statistical Analysis

Categorical data were compared using Fisher exact test, 2-sided *P* value, whereas for ordinal data nonparametric tests were used. The actuarial survival analysis was done according to the method described by Kaplan and Meier. Statistical analysis was done using the SPSS software package version 15 (SPSS, Chicago, IL).

RESULTS

Clinical Characteristics

The main clinical data of the 42 PBL and 3 extracavitary variants of PEL are summarized in Table 1 and Table 2. Patients with PBL were predominantly males

(81%) and had a median age of 48 years (range 11 to 86). HIV was positive in 27 (73%) of 37 patients with available information. Two HIV negative patients developed PBL after iatrogenic immunosuppression for Crohn disease and renal transplantation, respectively. Five patients were older than 65 years, HIV negative, and did not have other recognized causes of immunodeficiency. Thirty (71%) of the 42 PBL were presented in extranodal sites. The most common single site was the oral mucosa (37%) followed by the gastrointestinal tract (20%), soft tissue (20%), and skin (10%). The clinical presentation in monomorphic PBL and tumors with plasmacytic differentiation was relatively similar with a tendency of the latter to have nodal involvement (43% vs. 21%) but the difference was not statistically significant (Table 1). The clinical follow-up was available in 16 patients, 8 monomorphic PBL and 8 showing plasmacytic differentiation (Table 2). No significant differences in the overall survival of the patients with these 2 variants were observed.

All the patients with PEL were HIV positive. One patient had a solitary paravertebral mass from T12 to L2 (case 44). No other sites of involvement were detected and the patient was alive with no evidence of disease 3 years later. Two patients (cases 43 and 45) presented with a large cervical lymphadenopathy (case 43) and simultaneous axillary and retroperitoneal enlarged lymph nodes (case 45). In case 45, the clinical information was available, and the patient died rapidly after the diagnosis (2 mo).

Pathologic Features

The 42 PBL were further subclassified as monomorphic PBL (28 cases) and PBL with plasmacytic differentiation (14 cases) as earlier defined.¹⁴ All cases were negative for CD20 whereas CD79a was expressed in 14 cases (Table 1). *PAX-5* was only positive in 1 case that also expressed focal CD79a. All the other cases were *PAX-5* negative or weakly positive. MUM-1 and CD138 were positive in 20 (100%) and 26 (81%) of the tumors examined, respectively, with a similar proportion in monomorphic PBL and tumors with plasmacytic differentiation. CD56 was expressed in 5 (36%) of the 14 PBL with plasmacytic differentiation, but only in 2 (9%) of the 23 monomorphic PBL examined (*P* < 0.05). EBV was positive in 24 (59%) of the 41 PBL with a similar distribution in the monomorphic and plasmacytic variants (Table 1). Most of the cases had a latency type 1 with the expression of EBER but negative for LMP1 and EBNA2. Only 2 monomorphic PBL showed occasional cells positive for LMP1.

The extracavitary PEL were cytologically composed of large immunoblasts and plasmablasts admixed with more occasional anaplastic cells. One nodal case (case 43) showed a predominantly sinusoidal involvement, whereas the other had a tumoral and destructive pattern of growth. All cases expressed the HHV-8 latency antigen LANA-1 and EBV was present in 2 of the 3 cases with a type I latency.

TABLE 3. Frequency of the Genetic Alterations Detected by FISH

Probe	Alteration	All PBL Cases (%)	PBL Monomorphic (%)	PBL Plasmacytic Differentiation (%)	PEL (%)
<i>MYC</i>	Gain	8/41 (20)	4/28 (15)*	4/13 (31)*	1/3 (33)
	Rearrangement	20/41 (49)	16/28 (57)	4/13 (31)	0/3
<i>BCL2</i>	Gain	12/39 (31)	5/25 (20)	7/14 (50)	1/3 (33)
	Rearrangement	0/39	0/25	0/14	0/3
<i>BCL6</i>	Gain	16/38 (41)	8/24 (33)	8/14 (57)	0/3
	Rearrangement	0/38	0/24	0/14	0/3
<i>MALT1</i>	Gain	12/36 (33)	6/24 (25)	6/12 (50)	1/2 (50)
	Rearrangement	0/36	0/24	0/12	0/2
<i>PAX5</i>	Gain	12/37 (32)	5/24 (21)	7/13 (54)	1/3 (33)
	Rearrangement	0/36	0/23	0/13	0/3
<i>IGH</i>	Gain	7/38 (18)	2/25 (8)	5/13 (38)	0/3
	Rearrangement	16/38 (42)	13/25 (52)	3/13 (23)	0/3
≥ 3 gains		12/40 (30)	6/26 (23)	6/14 (43)	0/3

*One case with *MYC* translocated and gained is included in the category of rearrangements.

PBL (16 of 28, 57%) than in PBL with plasmacytic differentiation (4 of 13, 31%), but this difference was not statistically significant.

To determine whether the *IGH* gene was the possible partner of the rearranged *MYC*, we investigated the *MYC/IGH* dual color-dual fusion probe in 15 cases (Table 2). *MYC* was translocated with the *IGH* locus in 14 cases, 12 monomorphic PBL, and 2 PBL with plasmacytic differentiation (Fig. 1). Two monomorphic PBL in which the fusion probe could not be examined had both *MYC* and *IGH* rearrangements with the respective split probes and a normal pattern of the other loci (*BCL2*, *BCL6*, *MALT1*, *PAX5*) suggesting that *IGH* could also be the *MYC* partner in these cases. Four cases had a non-*IGH MYC* rearrangement and 1 of them had the *t(2;8)* detected by conventional cytogenetics. Thus, *MYC* rearrangements with *IG* gene loci were confirmed in 15 cases and suggested in 2 additional tumors. Only 1 case with a split in the *IGH* locus did not have *MYC* rearrangements (case 34). No rearrangements of the other loci studied were observed in this case.

The *MYC* rearrangement was the unique genetic alteration observed in 10 of the 39 PBL in which at least 3 of the other loci (*BCL2*, *BCL6*, *MALT1*, and *PAX5*) could be examined (Table 2). All cases with *MYC* rearrangement as a single alteration were monomorphic PBL. *MYC* rearrangements were more commonly found in the EBV-positive cases (14 of 19, 74%) than in the EBV-negative cases (9 of 21, 43%) ($P < 0.05$). The median overall survival of patients with and without *MYC* rearrangements was 7 and 15 months, respectively. This difference was not statistically significant.

No rearrangements of *BCL2*, *BCL6*, *MALT1*, or *PAX5* were detected in any PBL but gains of these loci were observed in 31% to 41% of the cases examined (Table 3). Gains of *PAX5* were significantly more common in PBL with plasmacytic differentiation (7 of 13, 54%) than in monomorphic tumors (5 of 24, 21%) ($P = 0.041$). No other associations were observed. Twelve of the 40 PBL in which 3 or more loci could be investigated had multiple simultaneous gains in 3 or

more loci, whereas single gains were detected only in 3 tumors (Fig. 2). Multiple gains were more frequent in PBL with plasmacytic differentiation (43%) than in the monomorphic variant (23%), but the difference was not statistically significant (Table 3). *BCL2* and *MALT1* loci were evaluable simultaneously in 31 cases. Coamplification of both loci was observed in 11 tumors and only 1 additional case had gains of *BCL2* but not of *MALT1*. The median overall survival of patients with 3 or more gains was 7 months, whereas it was not reached in patients with fewer than 3 gains. The difference was not statistically significant, probably owing to the low number of patients. Of note, however, the 4 patients with the longest survival (> 50 months) had no or fewer than 3 gains.

FISH Analysis in Primary Effusion Lymphomas

No rearrangements in any of the loci examined were observed in the 3 extracavitary PEL. One case had concomitant gains in *BCL2*, *MALT1*, and *PAX5*. Isolated gains of *MYC* were observed in an additional tumor.

DISCUSSION

Plasmablastic lymphoma is recognized as a distinct category of aggressive lymphoma with specific clinical and pathologic features.³⁵ However, little is known about the molecular and cytogenetic abnormalities of this tumor. The incidence of PBL is low and conventional cytogenetics or other techniques are difficult to carry out because of the frequent lack of availability of fresh or frozen samples. For these reasons, we have conducted a genetic study of these lymphomas using FISH and a panel of probes covering the genes and chromosomal regions most frequently altered in aggressive large B-cell lymphomas.

MYC rearrangements were the most common recurrent structural chromosomal alteration identified in PBL. They occurred in almost 50% of the cases and the immunoglobulin (*IG*) genes were the *MYC* partners in most tumors. We identified the *t(8;14)* using the fusion *MYC/IGH* probe in the 14 cases that could be examined. In 2 additional tumors simultaneous split signals of the

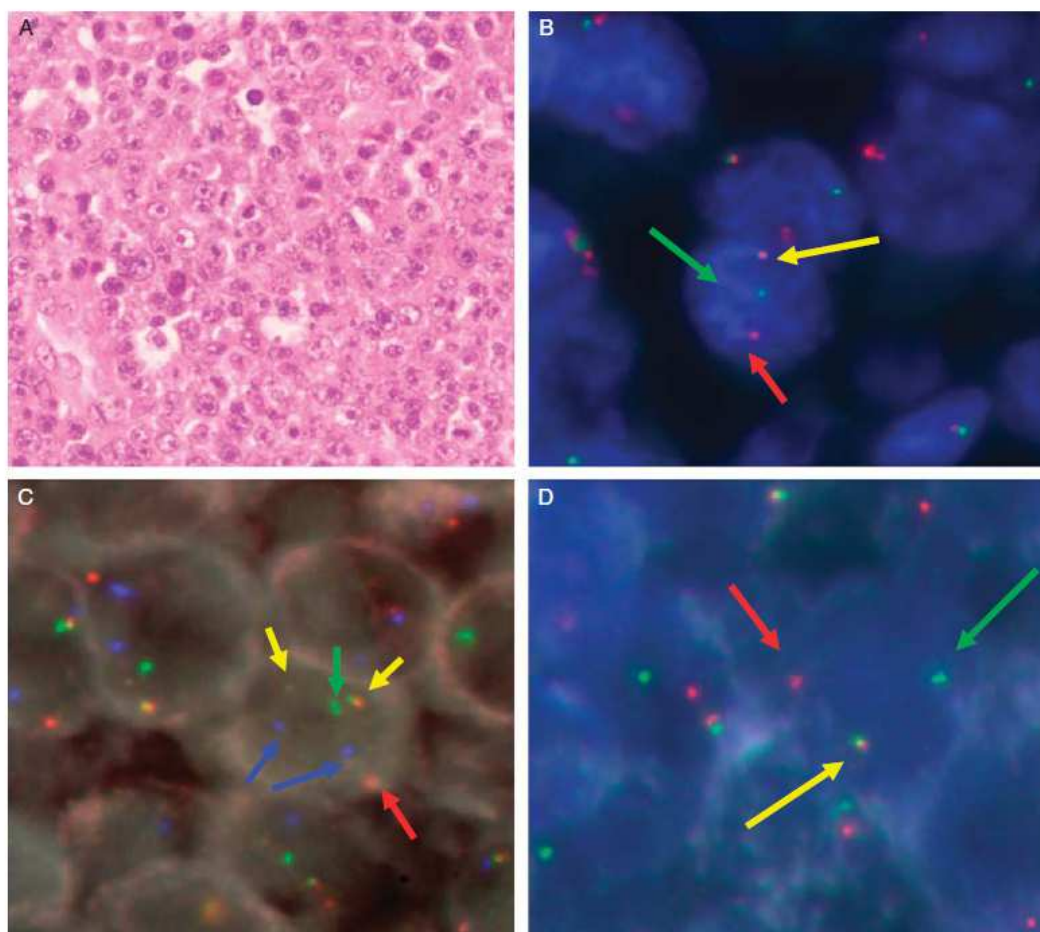


FIGURE 1. HE and FISH images of case 13 (A) monomorphic PBL. B, *MYC* rearranged (break-apart probe). C, *IGH/MYC* dual fusion probe; yellow signals indicate the *IGH/MYC* translocation, the green signal is the normal *IGH* locus, the red signal is the normal *MYC* locus, and the blue signals are the CEP8. D, *IGH* rearranged (break-apart probe).

MYC and *IGH* loci were observed, with the break-apart probes suggesting the presence of the *MYC/IGH* rearrangement also. In 1 of the 4 cases in which the *MYC* rearrangement was associated with a nonrearranged *IGH* locus, a *t(2;8)* translocation was shown by conventional cytogenetics. Thus, these results indicate that *IG* genes were the partner of *MYC* rearrangements in at least 17 of the 20 (85%) PBL. These findings are consistent with the earlier observations of *MYC* rearrangements in single case reports of PBL^{13,15,42} or small series.^{7,36} *IGH/MYC* rearrangements were detected in the 9 cases in which both the loci were examined. Conventional cytogenetic studies in PBL are very limited, but the earlier 7 cases published and our new reported case have been concordant with the FISH observations and show that the *MYC*

translocations occur in the context of very complex karyotypes.^{7,13,36,42}

In addition to *MYC* translocations, the PBL had frequent gains of the other loci examined with 30% of the cases showing gains in 3 or more of them. These findings are consistent with the complex karyotypes observed in the few conventional cytogenetic studies available. *MYC* rearrangements were seen more frequently in EBV + PBL and tumors with a monomorphic morphology, but this latter difference was not statistically significant. Although the number of patients with follow-up information was limited, no differences in the survival related to these genetic alterations were observed. Interestingly, some of our patients exhibited long survival and all of them had no or very few gains in the loci studied. Although the

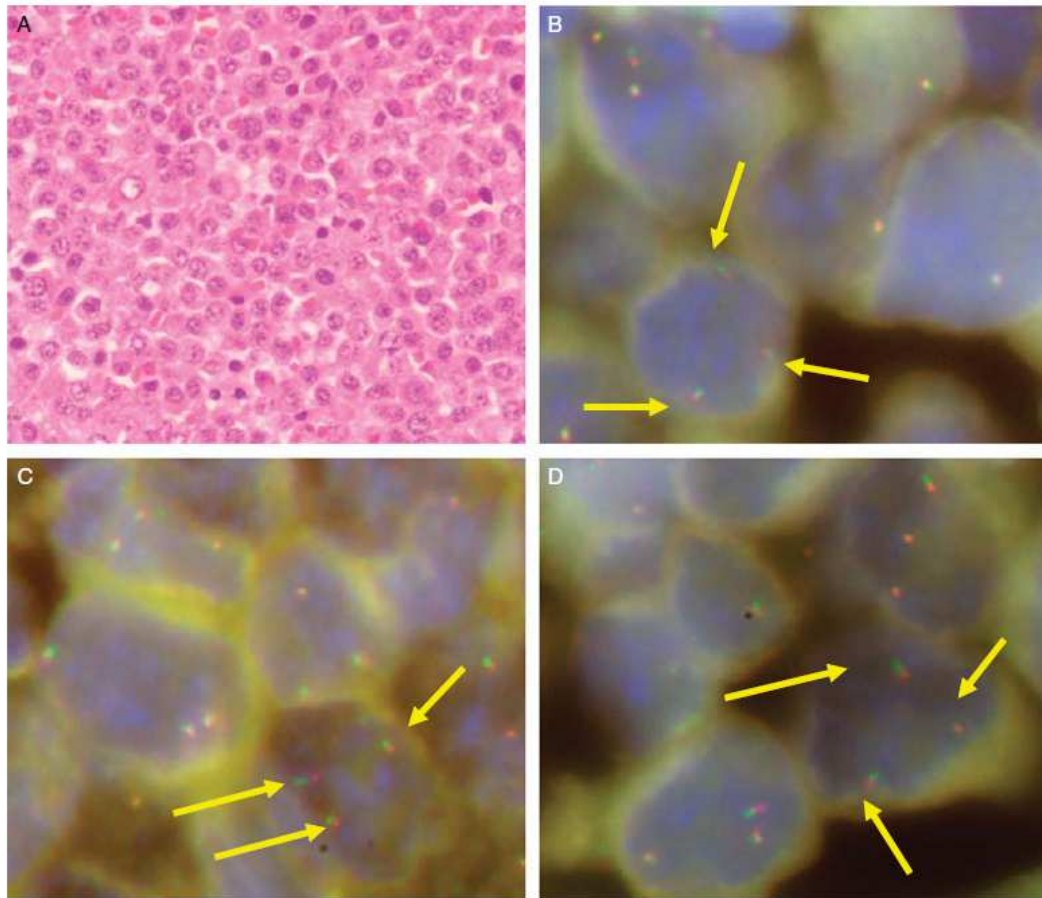


FIGURE 2. HE and FISH images of case 35. A, PBL with plasmacytic differentiation. B, *MYC* gained. C, *BCL6* gained. D, *PAX5* gained. Break-apart probes were used in these images.

initial descriptions of PBL highlighted the aggressive behavior and poor outcome, some recent reports have observed longer survivals similar to some of our patients.¹¹ This improvement in outcome has been related to new antiretroviral treatments, better immunologic status of the patients, and improvements in the supportive care and delivery of chemotherapy.

MYC rearrangement is a genetic feature characteristic of Burkitt lymphoma (BL) and more recently has also been recognized in the subsets of DLBCL with very aggressive clinical behavior.^{25,31,34} Our results indicate that the *MYC* translocations are also a common finding in PBL. Although all 3 of these lymphomas share the presence of *MYC* rearrangements, the incidence, *MYC* partner, and the genomic context in which this translocation emerges are different. Thus, the BL *MYC* translocation is present in virtually all cases, the partner is an *IG* gene, usually *IGH* and less frequently *IGK* or *IgL*, and

the translocation is the sole genetic alteration or is associated with very simple karyotypes. By contrast, an *MYC* translocation has been reported in 4% to 10% of DLBCL, usually associated with complex karyotypes,^{23,32} and in around 40% of the cases, the *MYC* is rearranged to a *non-IG* partner.²³ *MYC* rearrangements have been also associated with the *t(14;18)* or *BCL6* rearrangements in a subset of very aggressive lymphomas now recognized in the WHO classification as the provisional category of B-cell lymphoma unclassifiable with features intermediate between the DLBCL and BL.^{13,35} These translocations are associated with very complex karyotypes.^{23,32,34} Interestingly, a majority of the subtypes of lymphoma with *MYC* translocations have a germinal center phenotype. Thus, PBL carrying the *MYC* translocation show significant differences from other tumors that are *MYC*-translocation positive. The translocation is relatively common in PBL (50%), it is associated with complex

karyotypes but without other translocations considered as “double hits,” the partner is an *IG* locus, and the translocation occurs in a lymphoma with a terminal B-cell phenotype.

In addition to the *MYC* translocation, we found gains in 3 or more loci in 30% of the PBL. These gains tended to be more common in tumors with plasmacytic differentiation than in the monomorphic variant. Although 3q27 (*BCL6*) and 18q21 (*BCL2* or *MALT1*) translocations are common in the other types of DLBCL and are associated with the *MYC* translocation in the “double hit” tumors,³⁸ PBL do not have rearrangements in any of these loci. Gains of chromosome 3, particularly 3q, and 18q are common features of DLBCL of the GCB and ABC types, respectively.⁵ However, these alterations are mutually exclusive in most of these tumors.⁵ On the contrary, PBL have frequently simultaneous gains of these loci, reinforcing the idea that these tumors are genetically distinct from conventional DLBCL. Moreover, a recent study shows a different profile of gains in DLBCL arising in the HIV-positive patients. This study, based on SNPs array-CGH, obtains a very low frequency of gains of the genes included in our series.¹⁰

Plasmablastic lymphoma, particularly the plasmacytic variant, has morphologic and immunophenotypic features overlapping with extramedullary plasmablastic transformation of the plasma cell neoplasms.^{14,36,40} The clinical context, immunodeficiency status of the patient, and the EBV infection of the tumor are characteristics that may help to distinguish these 2 entities. *MYC* translocations in primary extramedullary plasmacytomas are uncommon but polysomies and *IG* gene breaks not associated with *MYC* are frequent.⁶ In multiple myeloma (MM), the *MYC* rearrangements have been detected in 0% to 15% of unselected cases^{2,29,37} but they may be seen in 45% of the advanced MM and in 65% of MM cell lines,^{19,20} indicating that this may be an acquired alteration associated with progression of the disease. However, about 40% of these *MYC* translocations involve a *non-IG* partner, a finding different from the frequent *IG/MYC* rearrangements observed in PBL. In contrast, the MM have frequent rearrangements of the *IGH* locus with partner other than *MYC* (ie, *CCND1*, *FGFR3*, *CCND3*, *MAF*)^{19,20} whereas *IGH* rearrangements in PBL seem to occur almost exclusively with the *MYC*.

Primary effusion lymphomas also share morphologic and immunophenotypic characteristics with PBL but the clinical context and the tumor infection by HHV8 are distinctive features. Genetic studies of PEL have shown complex karyotypes but not rearrangements of *MYC*, *BCL2*, *BCL6*, or other recurrent alterations.^{1,8,9} *MYC* translocations have been detected, however, in some cases of DLBCL, presenting clinically as primary effusion lymphomas but the mature B-cell phenotype and lack of HHV8 in these tumors rule out the diagnosis of PEL.^{18,24}

The high frequency of *IG/MYC* translocations in PBL suggest that *MYC* activation must play an important role in the pathogenesis of these tumors. Most lymphomas with *MYC* rearrangements have a germinal

center B-cell phenotype, whereas in PBL the activation of this gene occurs in the context of a terminal B-cell differentiation stage. One of the master regulators of plasma cell differentiation is the transcription factor BLIMP1 and this transcription factor is highly expressed in the PBL.^{3,22,30} BLIMP1 represses genes that maintain mature B-cell identity such as *PAX5*, and promotes the expression of genes such as *XBPI* involved in the plasma cell differentiation program. BLIMP1 also represses genes related to cell proliferation and growth including *MYC*.²⁸ The frequent incidence of *MYC* translocation in PBL may be an oncogenic mechanism that overcomes the repressor effect of BLIMP1 on *MYC* expression.

The *IG/MYC* translocations in PBL were frequently associated with the EBV infection. This finding is similar to BL in which EBV is also a common finding, particularly in endemic and immunodeficiency-associated tumors.^{13,35} The cooperative mechanisms between *MYC* and EBV in lymphomagenesis are not clear.²⁷ Interestingly, experimental studies in the tumor cell lines have shown that the full latency III program of EBV infection is incompatible with *MYC*-driven proliferation.²⁶ Consistent with this in vitro observation, EBV infection in both PBL and BL has a latency I program. Further studies will be required to elucidate the relationship between EBV and *MYC* activation in PBL.

In conclusion, our study shows that *MYC* translocations occur in 50% of the PBL, suggesting that it may play an important role in the pathogenesis of these tumors. *MYC* is usually rearranged with *IG* genes and the translocation occurs in the context of complex karyotypes. *BCL2*, *BCL6*, *MALT1*, and *PAX5* loci are frequently gained but not rearranged in these tumors. These findings indicate that PBL have a specific profile of genetic alterations that differs from that seen in other aggressive B-cell malignancies.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Elena Gonzalvo, Concha Muñoz, and Laura Gelabert for their excellent technical assistance. We also acknowledge R. Ramos from Hospital Son Dureta, Mallorca, Spain, J. Miró from Clínica Girona, Girona, Spain, M.J. Panadés from Hospital Arnau de Vilanova, Lleida, Spain, C. Martín from Hospital de Sant Camil, Barcelona, Spain, S. Martínez from Hospital Joan XXIII, Tarragona, Spain, and A. Ferrández from Hospital Clínic of Valencia, Spain for their collaboration providing samples of patients with PBL diagnosis.

REFERENCES

- Ascoli V, Mastroianni CM, Galati V, et al. Primary effusion lymphoma containing human herpesvirus 8 DNA in two AIDS patients with Kaposi's sarcoma. *Haematologica*. 1998;83:8–12.
- Avet-Loiseau H, Gerson F, Magrangeas F, et al. Rearrangements of the c-myc oncogene are present in 15% of primary human multiple myeloma tumors. *Blood*. 2001;98:3082–3086.
- Balague O, Martínez A, Colomo L, et al. Epstein-Barr virus negative clonal plasma cell proliferations and lymphomas in peripheral T-cell lymphomas: a phenomenon with distinctive clinicopathologic features. *Am J Surg Pathol*. 2007;31:1310–1322.

4. Bea S, Campo E. Secondary genomic alterations in non-Hodgkin's lymphomas: tumor-specific profiles with impact on clinical behavior. *Haematologica*. 2008;93:641–645.
5. Bea S, Zettl A, Wright G, et al. Diffuse large B-cell lymphoma subgroups have distinct genetic profiles that influence tumor biology and improve gene-expression-based survival prediction. *Blood*. 2005;106:3183–3190.
6. Bink K, Haralambieva E, Kremer M, et al. Primary extramedullary plasmacytoma: similarities with and differences from multiple myeloma revealed by interphase cytogenetics. *Haematologica*. 2008;93:623–626.
7. Bogusz AM, Seegmiller AC, Garcia R, et al. Plasmablastic lymphomas with MYC/IgH rearrangement: report of three cases and review of the literature. *Am J Clin Pathol*. 2009;132:597–605.
8. Boulanger E, Agbalika F, Maarek O, et al. A clinical, molecular and cytogenetic study of 12 cases of human herpesvirus 8 associated primary effusion lymphoma in HIV-infected patients. *Hematol J*. 2001;2:172–179.
9. Bubman D, Guasparri I, Cesarman E. Deregulation of c-Myc in primary effusion lymphoma by Kaposi's sarcoma herpesvirus latency-associated nuclear antigen. *Oncogene*. 2007;26:4979–4986.
10. Capello D, Scandurra M, Poretti G, et al. Genome wide DNA-profiling of HIV-related B-cell lymphomas. *Br J Haematol*. 2010;148:245–255.
11. Castillo J, Pantanowitz L, Dezube BJ. HIV-associated plasmablastic lymphoma: lessons learned from 112 published cases. *Am J Hematol*. 2008;83:804–809.
12. Chadburn A, Hyjek E, Mathew S, et al. KSHV-positive solid lymphomas represent an extra-cavitary variant of primary effusion lymphoma. *Am J Surg Pathol*. 2004;28:1401–1416.
13. Chuah KL, Ng SB, Poon L, et al. Plasmablastic lymphoma affecting the lung and bone marrow with CD10 expression and t(8;14)(q24;q32) translocation. *Int J Surg Pathol*. 2009;17:163–166.
14. Colomo L, Loong F, Rives S, et al. Diffuse large B-cell lymphomas with plasmablastic differentiation represent a heterogeneous group of disease entities. *Am J Surg Pathol*. 2004;28:736–747.
15. Dawson MA, Schwazer AP, McLean C, et al. AIDS-related plasmablastic lymphoma of the oral cavity associated with an IGH/MYC translocation—treatment with autologous stem-cell transplantation in a patient with severe haemophilia-A. *Haematologica*. 2007;92:e11–e12.
16. Delecluse HJ, Anagnostopoulos I, Dallenbach F, et al. Plasmablastic lymphomas of the oral cavity: a new entity associated with the human immunodeficiency virus infection. *Blood*. 1997;89:1413–1420.
17. Dong HY, Scadden DT, de Leval L, et al. Plasmablastic lymphoma in HIV-positive patients: an aggressive Epstein-Barr virus-associated extramedullary plasmacytic neoplasm. *Am J Surg Pathol*. 2005;29:1633–1641.
18. Fujisawa S, Tanioka F, Matsuoka T, et al. CD5+ diffuse large B-cell lymphoma with c-myc/IgH rearrangement presenting as primary effusion lymphoma. *Int J Hematol*. 2005;81:315–318.
19. Gabrea A, Leif BP, Michael KW. Distinguishing primary and secondary translocations in multiple myeloma. *DNA Repair (Amst)*. 2006;5:1225–1233.
20. Gabrea A, Martelli ML, Qi Y, et al. Secondary genomic rearrangements involving immunoglobulin or MYC loci show similar prevalences in hyperdiploid and nonhyperdiploid myeloma tumors. *Genes Chromosomes Cancer*. 2008;47:573–590.
21. Gaidano G, Cerri M, Capello D, et al. Molecular histogenesis of plasmablastic lymphoma of the oral cavity. *Br J Haematol*. 2002;119:622–628.
22. Garcia JF, Roncador G, Garcia JF, et al. PRDM1/BLIMP-1 expression in multiple B and T-cell lymphoma. *Haematologica*. 2006;91:467–474.
23. Hummel M, Bentink S, Berger H, et al. A biologic definition of Burkitt's lymphoma from transcriptional and genomic profiling. *N Engl J Med*. 2006;354:2419–2430.
24. Ichinohasama R, Miura I, Kobayashi N, et al. Herpes virus type 8-negative primary effusion lymphoma associated with PAX-5 gene rearrangement and hepatitis C virus: a case report and review of the literature. *Am J Surg Pathol*. 1998;22:1528–1537.
25. Johnson NA, Savage KJ, Ludkovski O, et al. Lymphomas with concurrent BCL2 and MYC translocations: the critical factors associated with survival. *Blood*. 2009;114:2273–2279.
26. Kelly GL, Milner AE, Baldwin GS, et al. Three restricted forms of Epstein-Barr virus latency counteracting apoptosis in c-myc-expressing Burkitt lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:14935–14940.
27. Klapproth K, Wirth T. Advances in the understanding of MYC-induced lymphomagenesis. *Br J Haematol*. 2010;149:484–497.
28. Lin Y, Wong K, Calame K. Repression of c-myc transcription by Blimp-1, an inducer of terminal B cell differentiation. *Science*. 1997;276:596–599.
29. Mohamed AN, Bentley G, Bonnett ML, et al. Chromosome aberrations in a series of 120 multiple myeloma cases with abnormal karyotypes. *Am J Hematol*. 2007;82:1080–1087.
30. Montes-Moreno S, Gonzalez-Molina AR, Rodriguez Pinilla SM, et al. Aggressive large B cell lymphoma with plasma cell differentiation: immunohistochemical characterization of plasmablastic lymphoma and diffuse large B cell lymphoma with partial plasmablastic phenotype. *Haematologica*. 2010;95:1342–1349.
31. Niitsu N, Okamoto M, Miura I, et al. Clinical features and prognosis of de novo diffuse large B-cell lymphoma with t(14;18) and 8q24/c-MYC translocations. *Leukemia*. 2009;23:777–783.
32. Salaverria I, Zettl A, Bea S, et al. Chromosomal alterations detected by comparative genomic hybridization in subgroups of gene expression-defined Burkitt's lymphoma. *Haematologica*. 2008;93:1327–1334.
33. Sawyer JR, Lukacs JL, Munshi N, et al. Identification of new nonrandom translocations in multiple myeloma with multicolor spectral karyotyping. *Blood*. 1998;92:4269–4278.
34. Snuderl M, Kolman OK, Chen YB, et al. B-cell lymphomas with concurrent IGH-BCL2 and MYC rearrangements are aggressive neoplasms with clinical and pathologic features distinct from Burkitt lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Surg Pathol*. 2010;34:327–340.
35. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. Lyon: IARC; 2008.
36. Taddesse-Heath L, Meloni-Ehrig A, Scheerle J, et al. Plasmablastic lymphoma with MYC translocation: evidence for a common pathway in the generation of plasmablastic features. *Mod Pathol*. 2010. doi:10.1038/modpathol.2010.72.
37. Tchinda J, Volpert S, Kropff M, et al. Frequent gains of the short arm of chromosome 9 in multiple myeloma with normal G-banded karyotype detected by comparative genomic hybridization. *Am J Clin Pathol*. 2004;122:875–882.
38. Tomita N, Tokunaka M, Nakamura N, et al. Clinicopathological features of lymphoma/leukemia patients carrying both BCL2 and MYC translocations. *Haematologica*. 2009;94:935–943.
39. van RA, Mason D, Jones M, et al. Translocation detection in lymphoma diagnosis by split-signal FISH: a standardised approach. *J Hematop*. 2008;1:119–126.
40. Vega F, Chang CC, Medeiros LJ, et al. Plasmablastic lymphomas and plasmablastic plasma cell myelomas have nearly identical immunophenotypic profiles. *Mod Pathol*. 2005;18:806–815.
41. Ventura RA, Martin-Subero JJ, 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.
42. Yotsumoto M, Ichikawa N, Ueno M, et al. CD20-negative CD138-positive leukemic large cell lymphoma with plasmablastic differentiation with an IgH/MYC translocation in an HIV-positive patient. *Intern Med*. 2009;48:559–562.

Treball 3

Els limfomes de cèl·lula gran B ALK positiu expressen el programa de diferenciació terminal de cèl·lula B i activació d'STAT3 però els hi manca reordenament de *MYC*

(Modern Pathology 2013;April 19, Epub ahead of print)

Resum

El limfoma de cèl·lula gran B ALK positiu (ALK+ LBCL) és una neoplasia limfoide agressiva caracteritzada per una proliferació monomòrfica de cèl·lules de tipus immunoblàstic que expressen un fenotipus plasmablàstic i que presenten reordenament del gen *ALK*. Els reordenaments de *MYC* són freqüents en els limfomes plasmablàstics, en els mielomes de cèl·lula plasmàtica avançats i en un subgrup de DLBCL, però la seva presència en ALK+ LBCLs és desconeguda. L'expressió de *MYC* està downregulada per *BLIMP1*, un dels més importants moduladors de la diferenciació de la cèl·lula plasmàtica. *BLIMP1* i *MYC* estan sobrerregulats per *STAT3*, un transductor de senyal activat per ALK. Per a determinar el paper de *BLIMP1*, *MYC* i *STAT3* en la patogènesi dels ALK+ LBCLs, varem estudiar el reordenament i expressió de *MYC*, *STAT3* fosforilat, *BLIMP1*, *PAX5* i *XBP1* en 12 ALK+LBCLs. Tots els casos expressaven ALK amb un patró citoplasmàtic i granular. Nou casos van presentar una senyal de trencament corresponent a un reordenament d'*ALK*. Tres casos addicionals varen presentar una deleció de l'extrem 5' o 3' de la sonda d'*ALK* associada amb una translocació críptica. *PAX5* fou virtualment negatiu en tots els casos analitzats, mentre que *BLIMP1* es va expressar en tots els tumors i *XBP1* en 11 de 12. *STAT3* fosforilat es va observar en tots els casos amb un patró d'expressió nuclear intens i difús. No es va identificar reordenament de *MYC* en cap tumor, però si que es van detectar guanys de *MYC* en 6 casos i amplificacions en un. Es va observar expressió proteica de *MYC* en tots els tumors independentment de les alteracions genètiques de *MYC*. Aquests resultats indiquen que els ALK+ LBCLs tenen un programa de diferenciació plasmablastic complet però, contràriament al limfoma plasmablàstic, careixen de reordenament de *MYC*. *STAT3* està constantment activat i podria ser un mecanisme alternatiu per a promoure l'expressió de *MYC* en aquests tumors. La rellevància de la via ALK/*STAT3* a la patogènesi d'ALK+ LBCL podria oferir una diana atractiva per a noves teràpies.

ALK-positive large B-cell lymphomas express a terminal B-cell differentiation program and activated STAT3 but lack *MYC* rearrangements

Alexandra Valera¹, Lluís Colomo¹, Antonio Martínez¹, Daphne de Jong², Olga Balagué², Gabriel Matheu³, Mónica Martínez⁴, Lekidelu Taddesse-Heath⁵, Elaine S Jaffe⁶, Carlos E Bacchi⁷ and Elías Campo¹

¹Hematopathology Section, Laboratory of Pathology, Hospital Clinic de Barcelona, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain; ²Department of Pathology, Netherlands Cancer Institute/Antoni van Leeuwenhoek Hospital, Amsterdam, The Netherlands; ³Department of Pathology, Hospital de Manacor, Manacor, Mallorca, Spain; ⁴Laboratorio de Hematopatología, Mendoza, Argentina; ⁵Department of Pathology, Howard University Hospital, Washington, MD, USA; ⁶Department of Pathology, National Cancer Institute, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA and ⁷Consultoria em Patologia, Botucatu, SP, Brazil

ALK-positive large B-cell lymphoma is an aggressive lymphoid neoplasm characterized by a monomorphic proliferation of immunoblast-like cells expressing a plasmablastic phenotype and carrying *ALK* rearrangements. *MYC* rearrangements are frequent in plasmablastic lymphomas, advanced plasma cell myelomas and a subgroup of diffuse large B-cell lymphomas, but their presence in ALK-positive large B-cell lymphomas is unknown. *MYC* expression is downregulated by BLIMP1, a master modulator of plasma cell differentiation. BLIMP1 and *MYC* are upregulated by STAT3, a signal transducer activated by ALK. To determine the role of BLIMP1, *MYC* and STAT3 in the pathogenesis of ALK-positive large B-cell lymphomas, we investigated *MYC* rearrangement and the expression of *MYC*, phosphorylated STAT3, BLIMP1, PAX5 and XBP1 in 12 ALK-positive large B-cell lymphomas. All cases expressed ALK with a granular cytoplasmic pattern. Nine cases had a split signal consistent with an *ALK* rearrangement. Three additional cases showed a deletion of the 5' or 3' end of the *ALK* probe consistent with cryptic translocation. PAX5 was virtually negative in all cases tested, whereas BLIMP1 was expressed in all tumors and XBP1 in 11 of 12. Phosphorylated STAT3 was observed in all cases with a strong and diffuse nuclear pattern. *MYC* rearrangements were not identified in any tumor, but *MYC* gains and amplification were detected in six cases and one case, respectively. *MYC* protein was expressed in all tumors independently of *MYC* gene alterations. These results indicate that ALK-positive large B-cell lymphomas express a complete plasmablastic differentiation program but, contrary to plasmablastic lymphomas, do not have *MYC* rearrangements. STAT3 is constantly activated and may be an alternative mechanism to promote *MYC* expression in these tumors. The relevance of the ALK/STAT3 pathway in the pathogenesis of ALK-positive large B-cell lymphomas may offer an attractive target for new therapies.

Modern Pathology advance online publication, 19 April 2013; doi:10.1038/modpathol.2013.73

Keywords: ALK-positive large B-cell lymphoma; ALK; *MYC*; plasmablastic lymphoma; STAT3

ALK-positive large B-cell lymphoma was initially described by Delsol *et al*¹ in 1997 as an uncommon

and aggressive subtype of diffuse large B-cell lymphoma with frequent immunoblastic morphology, a plasma cell phenotype and expression of the ALK protein. This protein is detected in most cases with a granular cytoplasmic pattern, which is commonly associated with the rearrangement of *ALK* with the clathrin gene *CTCL*, t(2;17).² However, other genetic partners as well as other patterns of cell localization of the ALK protein have been described.^{3–5} In addition to the *ALK* rearrangements, conventional cytogenetic studies have reported

Correspondence: Professor E Campo, MD, Hematopathology Section, Laboratory of Pathology, Hospital Clinic de Barcelona, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Universitat de Barcelona, Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain.

E-mail: ecampo@clinic.ub.es

Received 13 December 2012; revised 25 February 2013; accepted 27 February 2013; published online 19 April 2013

www.modernpathology.org

ALK-positive large B-cell lymphoma

A Valera et al

the presence of frequent complex karyotypes with multiple structural and numerical alterations in other chromosomes.^{2,6-14}

The oncogenic mechanisms involved in the pathogenesis of human ALK-positive large B-cell lymphomas are not well known. ALK protein is a cytoplasmic receptor with tyrosine kinase activity that is not normally expressed in lymphoid cells. ALK rearrangements upregulate oncogenic fusion proteins in which the ALK fragment contains the catalytic domain and the fused partner provides a dimerization domain that activates the receptor without the need of the ligand.^{15,16} ALK activation has the oncogenic potential in different types of cells including B and T lymphocytes, and in transgenic mice, it induces the development of plasma cell tumors.^{17,18} The dimerization of ALK leads to the activation of different downstream signaling pathways, one of the most relevant being the STAT3 pathway.^{19,20} STAT3 is an important signal transducer that triggers the program of plasma cell differentiation through BLIMP1 activation, XBP1 and IRF4 expression.²¹ ALK-positive large B-cell lymphomas have a phenotype similar to that of plasma cells, being negative for CD20 and positive for CD138. However, whether these tumors express a complete terminal B-cell differentiation program with the upregulation of BLIMP1 and XBP1 is not well known.²² STAT3 also regulates many proteins involved in tumor cell proliferation including MYC that may have an important role in the pathogenesis of these tumors.²³

The aggressive behavior of some B-cell lymphomas has been correlated with the presence of MYC rearrangement. This genetic alteration has been observed frequently in lymphoid neoplasms with plasma cell differentiation, such as plasmablastic plasma cell myelomas and plasmablastic lymphomas.²⁴⁻²⁶ On the other hand, MYC protein expression has been recently described in some aggressive B-cell lymphomas, not always related to

the presence of MYC gene alterations.²⁷⁻³⁰ The presence of MYC alteration and protein expression, as well as the activation of STAT3 in ALK-positive large B-cell lymphomas are not well known.

The aims of this study were to determine whether ALK-positive large B-cell lymphomas express a complete terminal B-cell differentiation program with the upregulation of BLIMP1 and XBP1 and whether MYC genetic alterations and STAT3 activation may play a role in the pathogenesis of these tumors.

Materials and methods

Case Selection

Twelve ALK-positive large B-cell lymphoma cases were retrieved from the files of the Pathology Department of the Hospital Clinic of Barcelona; Netherlands Cancer Institute (Amsterdam, The Netherlands); Laboratorio de Hematopatología (Mendoza, Argentina) and Consultoria em Patologia (Botucatu, Brazil). The patients were predominantly males (92%) with a median age of 33 years (range 22-42 years). Ten patients (83%) presented with nodal disease and two had extranodal presentation: one in the right colon and the other one in the soft tissues of the thigh (Table 1).

For comparison purposes, we also studied 11 plasmablastic lymphomas and 16 diffuse large B-cell lymphomas that were selected because they were of the activated B-cell subtype by gene expression profiling (11 cases) or had been classified immunohistochemically as non-germinal center-like subtype using the Hans' algorithm (5 cases).³¹

Immunohistochemistry

Immunohistochemical studies were carried out with a panel of monoclonal and polyclonal antibodies

Table 1 Clinical and pathological features of ALK+ LBCL

Case	Age (years)	Sex	Location	CD79a	PAX5	IGH IGL	IRF4 ^a	BLIMP1 ^a	XBP1 ^a	ALK FISH
1	34	M	Lymph node	-	ND	IgA +, lambda	-	+++	++	R
2	42	M	Lymph node	-	ND	IgA +, lambda	ND	++	-	DS + ALK extra copies
3	30	M	Lymph node	-	-	lambda	++	+++	+++	R + ALK extra copies
4	38	M	Right colon mass	ND	-	IgA +, kappa	-	NV	++	R + ALK extra copies
5	29	M	Lymph node	ND	-	IgA +, lambda	+	+++	+	R
6	28	M	Soft tissue of the thigh	-	-	IgA +, lambda	+++	+++	+	D 3' end + ALK extra copies
7	32	M	Lymph node	+	-	IgA +, kappa	+++	+++	+++	R
8	22	M	Lymph node	-	-	-	++	++	+++	DS
9	38	M	Lymph node	-	-	-	-	+	+	D 5' end
10	34	M	Lymph node	ND	Weak +	IgA +, IgG +, lambda	+++	+++	+	R
11	Un.	F	Lymph node	-	-	IgA +, IgG +, lambda	+	+++	+++	D 5' end + ALK extra copies
12	40	M	Lymph node	-	-	IgA +	++	+	++	R

R, rearrangement; DS, double split; D, deletion; ND, not determined; NV, not valuable; Un, unknown.

All cases showed positivity for EMA and CD138 and were negative for CD20.

^a +: 25-50%; ++: 50-75%; and +++: >75%.

reactive in paraffin-embedded tissue sections using a peroxidase-labeled detection system, standard antigen retrieval protocols and an automated immunostainer (Dako Autostainer, Glostrup, Denmark and Bond-Max, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). The panel of antibodies used included CD20 (clone L26; Dako), CD79a (clone JCB117; Dako), PAX5 (clone 24; BD Biosciences), CD30 (clone Ber-H2; Dako) and EMA (clone E29; Dako). Polyclonal antibodies for IgA, IgG, kappa and lambda were applied (all from Dako). ALK expression was determined using the monoclonal ALK1 antibody (Dako). The terminal B-cell differentiation program was evaluated using antibodies anti-IRF4 (clone MUM1p; Dako) and CD138 (clone MI15; Dako), PRDM1/Blimp1 (clone Sc13206; Santa Cruz Biotechnology) and XBP1 (clone Sc7160; Santa Cruz Biotechnology). The conditions for all these antibodies were the same as described previously.³² A cutoff of 25% was used to interpret the results as positive.

MYC expression was assessed using the monoclonal Y69 antibody (Epitomics), at dilution 1/40, with incubation of the primary antibody for 1 h after antigen retrieval at pH 6 for 30 min. The activation of STAT3 was analyzed using the monoclonal phosphorylated-STAT3 (pSTAT3, phosphorylation on tyrosine 705) antibody (clone D3A7; Cell Signaling Technology). The samples were incubated with this antibody at a dilution of 1:100 for 2 h at 37 °C. MYC and pSTAT3 immunostaining were evaluated in a semiquantitative manner and a normal tonsil tissue was used as the control. A cutoff of 25% was also used to interpret the results as positive.

The presence of Epstein-Barr virus was examined by *in situ* hybridization to detect Epstein-Barr virus-encoded early nuclear RNAs. The latency-associated nuclear antigen 1 of human herpes virus type 8 was studied by immunohistochemistry using the clone LN53 (Advanced Biotechnologies), both as described earlier.²⁵

Fluorescence *In Situ* Hybridization

Fluorescence *in situ* hybridization was performed on 3- to 4- μ m-thick sections of formalin-fixed, paraffin-embedded tissues, using break-apart probes (Vysis, Abbott Molecular) specific for *ALK* (2p13) and *MYC* (8q24) as described previously.²⁵

Tonsil sections were used as controls. For every tumor and tonsil sample, a minimum of 100 evaluable nuclei were scored. The cutoff values for the interphase FISH analyses were established following the criteria of Ventura *et al.*³³ To detect rearrangements, the cutoff value was 3%. Moreover, the mean number of numerical genetic alterations was evaluated in each case to assess the incidence of the genetic events in the tumors. Gains were considered when three to four copies of the gene studied were identified, whereas more than four

ALK-positive large B-cell lymphoma

A Valera *et al*

copies were considered as amplification. A deletion was considered when one of the alleles lost one of their extremes in >40% of the neoplastic cells.

Results

Pathological Features of ALK-Positive Large B-Cell Lymphomas

The clinical and immunophenotypic features of the 12 ALK-positive large B-cell lymphomas are summarized in Table 1. All cases had a granular cytoplasmic distribution of ALK expression. CD20 was negative in all of them. CD79a, PAX5 and CD30 were detected in isolated cells in 2/9, 1/10 and 2/12 cases, respectively, but none of the tumors had positivity for more than one of these B-cell markers. EMA was expressed in all cases. IgA was positive in 9/12 cases and two of them also expressed IgG. No clear expression of immunoglobulin heavy chains could be demonstrated in three cases. Lambda restriction was detected in 7/12 and kappa restriction in 2/12, and in 3 the study was not contributory. Epstein-Barr virus and/or human herpes virus type 8 were negative in all the cases investigated.

CD138 was positive in all cases examined. IRF4 was positive in 8/11 (73%) cases; two had weak expression in 10–25% of the neoplastic cells and one was negative. BLIMP1 was positive in all cases, most of them with strong expression in >50% of the cells. Similarly, XBP1 was also expressed in 11 of 12, although the number of positive cells was slightly lower than for BLIMP1.

The *ALK* break-apart probe showed different patterns of rearrangement and alterations in all cases (Table 1 and Figure 1). Seven of 12 (58%) cases showed a split *ALK* signal consistent with a chromosomal rearrangement (cases 1, 3, 4, 5, 7, 10 and 12). Two of these cases also had extra normal copies of the normal allele (cases 3 and 4). A split signal of both alleles was observed in two other cases (cases 2 and 8) and one of them also showed extra copy signals of normal *ALK* allele (case 8). Two other cases exhibited isolated copies of 3' end (telomeric region) (cases 9 and 11), one of them with additional copies of the normal *ALK* (case 11). One additional case showed isolated extra copies of the 5' end of *ALK* (centromeric region) and of the normal allele (case 6). These three cases with deletions of the 3' or 5' ends had *ALK* protein expression with the same granular cytoplasmic pattern as the other cases.

MYC Gene Alterations and Protein Expression

The genetic alterations and protein expression of MYC in ALK-positive large B-cell lymphomas, plasmablastic lymphomas and diffuse large B-cell lymphomas are summarized in Table 2 and Figure 2. MYC analysis by FISH was successful in the 11

ALK-positive large B-cell lymphoma

A Valera et al

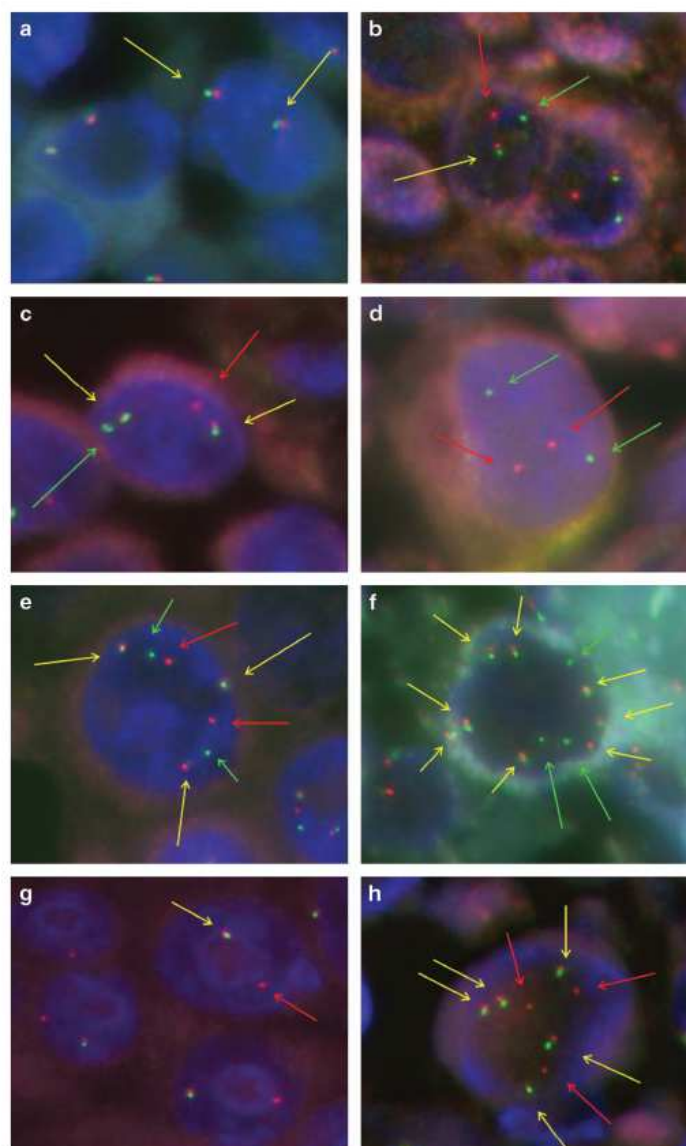


Figure 1 Different ALK patterns detected by fluorescence *in situ* hybridization (FISH). (a) Normal ALK pattern observed in a reactive lymph node; (b) case 1, simple rearrangement; (c) case 3, simple rearrangement and extra copies; (d) case 8, double rearrangement; (e) case 2, double rearrangement and extra copies; (f) case 6, three loci with deletion of the 3' end and extra copies; (g) case 9, deletion of the 5' end; (h) case 11, three loci with deletion of the 5' end and extra copies. Yellow arrow: normal signal of ALK; red arrow: split signal of ALK, 3' end; and green arrow: split signal of ALK, 5' end.

ALK-positive large B-cell lymphomas cases studied. Six cases showed an increased copy number of the gene, 5 gains (cases 4, 5, 10, 11 and 12) and 1 amplification (case 3), whereas 5 cases did not show any genetic alteration. The mean copy number gains per cell was 3.26 (range 2.76–3.87) and the

amplified copies 5.84. No evidence of *MYC* rearrangement was detected in any case.

MYC protein was expressed in the 12 cases. Six tumors had *MYC* positivity in 25–50% of the cells and three of them had *MYC* gains (cases 10, 11 and 12). Three cases had *MYC* expression in 50–75% of the

ALK-positive large B-cell lymphoma

A Valera *et al***Table 2** MYC: Genetic alterations by FISH and protein expression by IHC

Case no.	Diagnosis	MYC IHC (%)	MYC FISH	pSTAT3 (%)
1	ALK+LBCL	>90	N	>75
2	ALK+LBCL	>75	N	100
3	ALK+LBCL	>75	Amplifications	100
4	ALK+LBCL	50-75	Gains	100
5	ALK+LBCL	50-75	Gains	100
6	ALK+LBCL	50-75	N	100
7	ALK+LBCL	25-50	N	100
8	ALK+LBCL	25-50	N	100
9	ALK+LBCL	25-50	N	100
10	ALK+LBCL	25-50	Gains	100
11	ALK+LBCL	25-50	Gains	100
12	ALK+LBCL	25-50	Gains	50-75
13	PBL	50-75	Rearrangement	50-75
14	PBL	50-75	Rearrangement	ND
15	PBL	25-50	Rearrangement	50-75
16	PBL	25-50	Gains	NV
17	PBL	—	Gains	ND
18	PBL	50-75	Rearrangement	ND
19	PBL	25-50	Gains	50-75
20	PBL	—	Gains	—
21	PBL	—	Gains	100
22	PBL	25-50	N	—
23	PBL	—	N	ND
24	DLBCL	>75	N	50-75
25	DLBCL	25-50	Rearranged	ND
26	DLBCL	25-50	N	ND
27	DLBCL	25-50	N	—
28	DLBCL	—	N	50-75
29	DLBCL	—	N	—
30	DLBCL	—	N	—
31	DLBCL	—	N	—
32	DLBCL	—	N	ND
33	DLBCL	—	N	ND
34	DLBCL	—	Gains	—
35	DLBCL	>75	N	—
36	DLBCL	50-75	N	—
37	DLBCL	50-75%	N	50-75
38	DLBCL	—	N	50-75
39	DLBCL	—	N	ND

ALK+ LBCL, ALK-positive large B-cell lymphoma; PBL, plasmablastic lymphoma; DLBCL, diffuse large B-cell lymphoma, all cases were ABC subtype by gene expression profile or non-GCB by immunohistochemistry; N, normal FISH pattern; NV, not valuable; ND, not determined; Gains, 3-4 copies; amplification, >4 copies.

neoplastic cells, and two of them had *MYC* gains (cases 4 and 5). The other three tumors showed *MYC* expression in >75% of the tumor cells and one of them demonstrated amplification of the gene (case 3). No gene alterations were observed in six cases.

In plasmablastic lymphomas, *MYC* genetic alterations were observed in 9/11 cases, 4 rearrangements and 5 gains. *MYC* expression was detected in 7/11 cases. Four cases were positive in 25-50% of the neoplastic cells, two of them showed *MYC* gains (cases 16 and 19), one had a gene rearrangement and no gene alterations were observed in one. Three tumors were *MYC* positive in 50-75% and all of them had *MYC* rearrangement (cases 13, 14 and 18). No *MYC* expression was observed in three plasmablastic lymphomas with *MYC* gains (cases 17, 20 and 21) (Table 2).

In diffuse large B-cell lymphomas, *MYC* genetic alterations were observed in 2/16 cases, one rearrangement and one gain. *MYC* expression was detected in 7/16 cases. Two cases showed *MYC* expression in >75% of the neoplastic cells, both without any *MYC* gene alteration (cases 24 and 35). In two cases, *MYC* expression was observed in 50-75% of the tumor cells, but none of them showed *MYC* gene alterations by fluorescence *in situ* hybridization (cases 36 and 37). Three additional cases showed *MYC* expression in 25-50% of the neoplastic cells (cases 25, 26 and 27) and one of them presented rearrangement of the gene (case 25).

pSTAT3 Expression

pSTAT3 expression in ALK-positive large B-cell lymphomas, plasmablastic and diffuse large B-cell lymphoma-activated B-cell subtype is detailed in Table 2 and Figure 2. All ALK-positive large B-cell lymphomas were strongly positive for pSTAT3. This overexpression was observed in virtually all neoplastic cells, except in one case (case 12).

In plasmablastic lymphomas, pSTAT3 expression was observed in 4/6 cases. Three of them (cases 13, 15 and 19) showed pSTAT3 expression in 50-75% of the neoplastic cells. *MYC* expression correlated with pSTAT3 expression in these cases. The fourth case (case 21) showed pSTAT3 expression in virtually 100% of the neoplastic cells, but *MYC* expression was negative. Two cases were negative for pSTAT3, one expressed *MYC* in 25-50% and the other was negative.

pSTAT3 expression was detected in 4/11 diffuse large B-cell lymphoma cases in 50-75% of the neoplastic cells. Two of these cases (cases 24 and 37) also showed *MYC* expression in a similar percentage, whereas the other two cases were negative for *MYC* (cases 28 and 38). None of them had *MYC* genetic alterations. Three cases without pSTAT3 expression (cases 27, 35 and 36) expressed *MYC*, but none of them showed genetic alterations of the gene.

Discussion

ALK-positive large B-cell lymphoma is an uncommon subtype of diffuse large B-cell lymphoma carrying *ALK* rearrangement and protein expression. The most common gene partner of *ALK* in these tumors is *CLTC* at 17q23^{2,8,14,34-41} followed by *NPM1* at 5q35^{6,10} and other genes identified in occasional cases such as *SQSTM1*⁴² and *SEC31A*.¹³ Genetic studies have recognized other translocations between *ALK* and chromosomal regions at 4q22, 12q24 or Xq21, but the corresponding gene partner has not been identified.^{11,12} All these translocations lead to the overexpression and oncogenic activation of the *ALK* protein. The *CLTC-ALK* fusion generates a protein recognizable by immunohistochemistry with a cytoplasmic

ALK-positive large B-cell lymphoma

A Valera et al

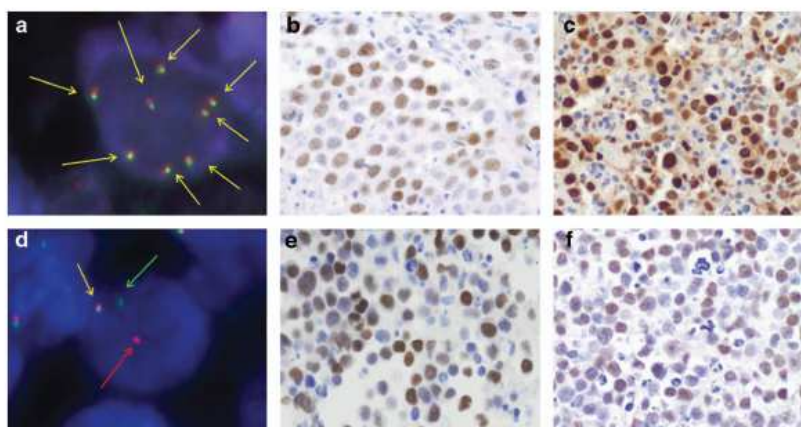


Figure 2 Phosphorylated signal transducers and activators of transcription-3 (pSTAT3) and MYC in ALK + large B-cell lymphoma (LBCL), plasmablastic lymphoma (PBL) and activated B-cell-like (ABC) diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL). (a) Case 3, MYC amplified in an ALK + LBCL; (b) case 3, MYC protein expression in >75% of the cells; (c) case 3, pSTAT3 expression in all tumor cells; (d) case 13, MYC rearranged in a PBL case; (e) case 13, MYC protein expression in 50–75% of the neoplastic cells; (f) case 13, pSTAT3 protein expression in 50–75% of the tumor cells. Immunohistochemistry (IHC) images (b, c, e and f) photographed at $\times 400$. Yellow arrow: normal signal of MYC; red arrow: split signal of MYC, 5' end; green signal: split signal of MYC, 3' end.

granular pattern. However, this pattern is also detected in other translocations, with the exception of the nuclear and cytoplasmic pattern of the *NPM1-ALK* fusion. All our cases had ALK expression with a cytoplasmic granular pattern, although the partner involved could not be determined since we used a break-apart *ALK* probe. A split signal consistent with an *ALK* translocation was detected in 7 of the 12 cases. Intriguingly, two cases showed only a deletion of the 5' end of the probe. This FISH pattern has been observed occasionally in ALK-positive large B-cell lymphomas.^{4,11–13} The combination of FISH and molecular studies have confirmed that this pattern is due to cryptic translocations of the 3' end of *ALK* fused with different partners and associated with the deletion of the *ALK* 5' end. Similar to the reported cases, our two tumors with the 5' end deletion expressed ALK with the same granular cytoplasmic pattern as the other cases with the typical split signal. In addition to the rearranged gene, our FISH study detected double splits in two cases and extra copies of the normal *ALK* gene in five cases. These findings are consistent with the multiple chromosomal alterations and karyotypes close to the tetraploidy detected in around 50% of these tumors by conventional cytogenetics.^{2,6–14} However, as we have not used centromere probe in this study, we cannot distinguish between true polysomies or partial chromosomal gains. We also found a case with deletion of 3' end, which has not been reported before in the literature. This case also expressed ALK protein with the same granular and cytoplasmic pattern of expression, suggesting that *ALK* may have a cryptic rearrangement with a similar functional effect upregulating ALK protein.

The oncogenic pathways involved in the pathogenesis of ALK-positive large B-cell lymphomas are not well defined. *ALK* rearrangements produce fusion proteins with constitutive tyrosine kinase activity, which activates several downstream pathways. One of them is the activation of STAT3 signaling that seems to be required for ALK-mediated lymphomagenesis in different cell models including murine and human B and T cells.^{19,20,43} In this study, we have demonstrated that activated pSTAT3 is strongly expressed in all ALK-positive large B-cell lymphomas. These observations expand the previous identification of pSTAT3 in two ALK-positive large B-cell lymphomas⁴⁴ and suggest that this pathway may be important in the pathogenesis of these lymphomas. The relevance of STAT3 in ALK-positive large B-cell lymphomas is highlighted by its downregulation in cell lines derived from these tumors treated with an ALK inhibitor.^{7,13}

The strong and constant expression of pSTAT3 in ALK-positive large B-cell lymphomas contrasted with the lower expression observed in non-germinal center B-cell-like diffuse large B-cell lymphomas (36%) and slightly lower in plasmablastic lymphomas (67%). STAT3 has not been previously investigated in plasmablastic lymphoma and our findings suggest that this pathway may be also relevant in these tumors. The expression of pSTAT3 observed in our subset of non-germinal center B-cell-like diffuse large B-cell lymphomas is similar to the frequency observed in previous studies.^{45,46} Although the prognostic significance of this finding in diffuse large B-cell lymphoma is controversial,^{47,48} studies in cell lines and animal models suggest that STAT3 may be a relevant therapeutic target for this subgroup of diffuse large B-cell lymphomas.^{45,46,49}

ALK-positive large B-cell lymphoma

A Valera *et al*

The high expression of pSTAT3 in ALK-positive large B-cell lymphomas may be relevant for the plasmablastic phenotype of these tumors since STAT3 promotes the upregulation of BLIMP1, a master regulator of the plasma cell differentiation program.²¹ Previous studies have characterized the phenotype of ALK-positive large B-cell lymphomas with CD138 positivity and lack of mature B-cell markers such as CD20 and CD79a, but the expression of BLIMP1 and other markers of the plasma cell differentiation program was not known. Consistent with the role of pSTAT3, we have demonstrated that ALK-positive large B-cell lymphomas constantly express BLIMP1 and it seems to be functional because the tumors lack *PAX5* and express *XBP1*, two genes, respectively, repressed and upregulated by BLIMP1. *PAX5* is essential to maintain the mature B-cell identity and its repression is required for the development of the plasma cell differentiation program, whereas *XBP1* is an important transcription factor that modulates the terminal B-cell differentiation program.^{50,51} This complete plasmablastic phenotype observed in ALK-positive large B-cell lymphomas is less common in plasmablastic lymphomas. These tumors constantly express BLIMP1 in virtually all cases, but *XBP1* is only expressed in approximately 50% of them.^{52,53}

MYC rearrangements have been observed in 50% of plasmablastic lymphomas and plasmablastic plasma cell myelomas. BLIMP1, constantly expressed in these tumors, represses genes related to cell proliferation and growth including *MYC*.⁵⁴ The high frequency of *MYC* rearrangements in these tumors may be an oncogenic mechanism to overcome the repressor effect of BLIMP1 on *MYC* expression.²⁵ In this study, we have observed that, contrary to plasmablastic lymphomas, ALK-positive large B-cell lymphomas do not have *MYC* rearrangements, although one case had *MYC* amplifications. In spite of the low incidence of genetic alterations, *MYC* protein was expressed in all tumors, suggesting that it may be important for the pathogenesis of the tumor. Previous studies have shown that *MYC* is downstream of ALK⁵⁵ and may also be a target of activated STAT3.^{56,57} Therefore, *MYC* expression in ALK-positive large B-cell lymphomas may be driven by these alternative mechanisms that, as postulated for plasmablastic lymphomas, may lead to overcome the repressor effect of BLIMP1.

In conclusion, our study shows that ALK-positive large B-cell lymphomas express markers associated with a complete plasma cell differentiation program and active STAT3, but contrary to other aggressive neoplasms with plasmablastic phenotype lack *MYC* rearrangements. These findings are consistent with a model in which *ALK* rearrangements activate STAT3 that in turn promotes the plasma cell differentiation program through BLIMP1, and upregulates the expression of *MYC* (Figure 3). The relevance of the ALK/STAT3 pathway in the pathogenesis of these lymphomas may offer an attractive target for new therapies.

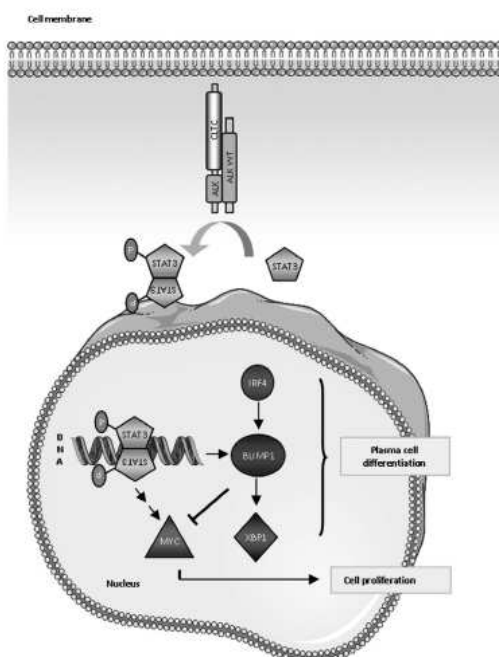


Figure 3 Model of signal transducers and activators of transcription-3 (STAT3) activation and BLIMP1 and *MYC* expression in ALK+ large B-cell lymphoma (LBCL). ALK rearranged receptor bound to a non-rearranged ALK receptor (ALK wild type, ALK WT) triggers a STAT3 homodimer formation without the presence of an external ligand. STAT3 dimerization results in the phosphorylation of its tyrosine residues. This activation allows the entrance of the STAT3 dimer into the nucleus of the cell, where it promotes the activation of BLIMP1, which jointly with interferon regulatory factor-4 (IRF4) and X-box binding protein 1 (XBP1) trigger the plasma cell differentiation, and the activation of *MYC* in the cell proliferation.

Acknowledgements

We thank Elena Gonzalvo, Laura Gelabert and Mònica Marín for their excellent technical assistance. This study was funded by 'Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología Española' (CICYT) SAF 12/38432, Red Temática de Investigación Cooperativa del Cáncer (RTICC) (RD12/0036/0086) and 'Conveni Programa de Feno/Genotipatge per al diagnòstic i tractament individualitzat del pacient oncològic, La Caixa'. Figure 3 was produced using Servier Medical Art (<http://www.servier.com/>).

Disclosure/conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- 1 Delsol G, Lamant L, Mariame B, *et al*. A new subtype of large B-cell lymphoma expressing the ALK kinase

ALK-positive large B-cell lymphoma

A Valera *et al*

- and lacking the 2; 5 translocation. *Blood* 1997;89:1483–1490.
- 2 Gascoyne RD, Lamant L, Martin-Subero JI, *et al*. ALK-positive diffuse large B-cell lymphoma is associated with Clathrin-ALK rearrangements: report of 6 cases. *Blood* 2003;102:2568–2573.
 - 3 Beltran B, Castillo J, Salas R, *et al*. ALK-positive diffuse large B-cell lymphoma: report of four cases and review of the literature. *J Hematol Oncol* 2009;2:11.
 - 4 Lee HW, Kim K, Kim W, *et al*. ALK-positive diffuse large B-cell lymphoma: report of three cases. *Hematol Oncol* 2008;26:108–113.
 - 5 Ott G, Bastian BC, Katzenberger T, *et al*. A lymphohistiocytic variant of anaplastic large cell lymphoma with demonstration of the t(2;5)(p23;q35) chromosome translocation. *Br J Haematol* 1998;100:187–190.
 - 6 Adam P, Katzenberger T, Seeberger H, *et al*. A case of a diffuse large B-cell lymphoma of plasmablastic type associated with the t(2;5)(p23;q35) chromosome translocation. *Am J Surg Pathol* 2003;27:1473–1476.
 - 7 Cerchetti L, mm-Welk C, Vater I, *et al*. Inhibition of anaplastic lymphoma kinase (ALK) activity provides a therapeutic approach for CLTC-ALK-positive human diffuse large B cell lymphomas. *PLoS One* 2011;6:e18436.
 - 8 De Paepe P, Baens M, van KH, *et al*. ALK activation by the CLTC-ALK fusion is a recurrent event in large B-cell lymphoma. *Blood* 2003;102:2638–2641.
 - 9 Ishii K, Yamamoto Y, Nomura S. CD30-negative diffuse large B-cell lymphoma expressing ALK. *Rinsho Ketsueki* 2005;46:501–506.
 - 10 Onciu M, Behm FG, Downing JR, *et al*. ALK-positive plasmablastic B-cell lymphoma with expression of the NPM-ALK fusion transcript: report of 2 cases. *Blood* 2003;102:2642–2644.
 - 11 Shi M, Miron PM, Hutchinson L, *et al*. Anaplastic lymphoma kinase-positive large B-cell lymphoma with complex karyotype and novel ALK gene rearrangements. *Hum Pathol* 2011;42:1562–1567.
 - 12 Stachurski D, Miron PM, Al-Homsi S, *et al*. Anaplastic lymphoma kinase-positive diffuse large B-cell lymphoma with a complex karyotype and cryptic 3' ALK gene insertion to chromosome 4 q22-24. *Hum Pathol* 2007;38:940–945.
 - 13 Van Roosbroeck K, Cools J, Dierickx D, *et al*. ALK-positive large B-cell lymphomas with cryptic SEC31A-ALK and NPM1-ALK fusions. *Haematologica* 2010;95:509–513.
 - 14 Zhang D, Denley RC, Filippa DA, *et al*. ALK-positive diffuse large B-cell lymphoma with the t(2;17)(p23;q23). *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2009;17:172–177.
 - 15 Chiarle R, Voena C, Ambrogio C, *et al*. The anaplastic lymphoma kinase in the pathogenesis of cancer. *Nat Rev Cancer* 2008;8:11–23.
 - 16 Mosse YP, Wood A, Maris JM. Inhibition of ALK signaling for cancer therapy. *Clin Cancer Res* 2009;15:5609–5614.
 - 17 Chiarle R, Gong JZ, Guasparri I, *et al*. NPM-ALK transgenic mice spontaneously develop T-cell lymphomas and plasma cell tumors. *Blood* 2003;101:1919–1927.
 - 18 Kuefer MU, Look AT, Pulford K, *et al*. Retrovirus-mediated gene transfer of NPM-ALK causes lymphoid malignancy in mice. *Blood* 1997;90:2901–2910.
 - 19 Chiarle R, Simmons WJ, Cai H, *et al*. Stat3 is required for ALK-mediated lymphomagenesis and provides a possible therapeutic target. *Nat Med* 2005;11:623–629.
 - 20 Zamo A, Chiarle R, Piva R, *et al*. Anaplastic lymphoma kinase (ALK) activates Stat3 and protects hematopoietic cells from cell death. *Oncogene* 2002;21:1038–1047.
 - 21 Diehl SA, Schmidlin H, Nagasawa M, *et al*. STAT3-mediated up-regulation of BLIMP1 is coordinated with BCL6 down-regulation to control human plasma cell differentiation. *J Immunol* 2008;180:4805–4815.
 - 22 Montes-Moreno S, Montalban C, Piris MA. Large B-cell lymphomas with plasmablastic differentiation: a biological and therapeutic challenge. *Leuk Lymphoma* 2012;53:185–194.
 - 23 Yu H, Kortylewski M, Pardoll D. Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol* 2007;7:41–51.
 - 24 Taddese-Heath L, Meloni-Ehrig A, Scheerle J, *et al*. Plasmablastic lymphoma with MYC translocation: evidence for a common pathway in the generation of plasmablastic features. *Mod Pathol* 2010;23:991–999.
 - 25 Valera A, Balague O, Colomo L, *et al*. IG/MYC rearrangements are the main cytogenetic alteration in plasmablastic lymphomas. *Am J Surg Pathol* 2010;34:1686–1694.
 - 26 Avet-Loiseau H, Gerson F, Magrangeas F, *et al*. Rearrangements of the c-myc oncogene are present in 15% of primary human multiple myeloma tumors. *Blood* 2001;98:3082–3086.
 - 27 Green TM, Nielsen O, de SK, *et al*. High levels of nuclear MYC protein predict the presence of MYC rearrangement in diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Surg Pathol* 2012;36:612–619.
 - 28 Kluk MJ, Chapuy B, Sinha P, *et al*. Immunohistochemical detection of MYC-driven diffuse large B-cell lymphomas. *PLoS One* 2012;7:e33813.
 - 29 Ruzinova MB, Caron T, Rodig SJ. Altered subcellular localization of c-Myc protein identifies aggressive B-cell lymphomas harboring a c-MYC translocation. *Am J Surg Pathol* 2010;34:882–891.
 - 30 Tapia G, Lopez R, Munoz-Marmol AM, *et al*. Immunohistochemical detection of MYC protein correlates with MYC gene status in aggressive B cell lymphomas. *Histopathology* 2011;59:672–678.
 - 31 Swerdlow SH, Campo E, Harris N, *et al*. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. IARC Press: Lyon, France, 2008.
 - 32 Gutierrez-Garcia G, Cardesa-Salzmann T, Climent F, *et al*. Gene-expression profiling and not immunophenotypic algorithms predicts prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with immunotherapy. *Blood* 2011;117:4836–4843.
 - 33 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.
 - 34 Bubala H, Maldyk J, Wlodarska I, *et al*. ALK-positive diffuse large B-cell lymphoma. *Pediatr Blood Cancer* 2006;46:649–653.
 - 35 Chikatsu N, Kojima H, Suzukawa K, *et al*. ALK+, CD30-. *Mod Pathol* 2003;16:828–832.
 - 36 Gesk S, Gascoyne RD, Schnitzer B, *et al*. ALK-positive diffuse large B-cell lymphoma with ALK-Clathrin fusion belongs to the spectrum of pediatric lymphomas. *Leukemia* 2005;19:1839–1840.
 - 37 Isimbaldi G, Bandiera L, d'Amore ES, *et al*. ALK-positive plasmablastic B-cell lymphoma with the

ALK-positive large B-cell lymphoma

A Valera *et al*

- clathrin-ALK gene rearrangement. *Pediatr Blood Cancer* 2006;46:390–391.
- 38 Laurent C, Do C, Gascoyne RD, *et al*. Anaplastic lymphoma kinase-positive diffuse large B-cell lymphoma: a rare clinicopathologic entity with poor prognosis. *J Clin Oncol* 2009;27:4211–4216.
- 39 Li S. Anaplastic lymphoma kinase-positive large B-cell lymphoma: a distinct clinicopathological entity. *Int J Clin Exp Pathol* 2009;2:508–518.
- 40 McManus DT, Catherwood MA, Carey PD, *et al*. ALK-positive diffuse large B-cell lymphoma of the stomach associated with a clathrin-ALK rearrangement. *Hum Pathol* 2004;35:1285–1288.
- 41 Reichard KK, McKenna RW, Kroft SH. ALK-positive diffuse large B-cell lymphoma: report of four cases and review of the literature. *Mod Pathol* 2007;20:310–319.
- 42 Takeuchi K, Soda M, Togashi Y, *et al*. Identification of a novel fusion, SQSTM1-ALK, in ALK-positive large B-cell lymphoma. *Haematologica* 2011;96:464–467.
- 43 Barreca A, Lasorsa E, Riera L, *et al*. Anaplastic lymphoma kinase in human cancer. *J Mol Endocrinol* 2011;47:R11–R23.
- 44 Momose S, Tamaru J, Kishi H, *et al*. Hyperactivated STAT3 in ALK-positive diffuse large B-cell lymphoma with clathrin-ALK fusion. *Hum Pathol* 2009;40:75–82.
- 45 Ding BB, Yu JJ, Yu RY, *et al*. Constitutively activated STAT3 promotes cell proliferation and survival in the activated B-cell subtype of diffuse large B-cell lymphomas. *Blood* 2008;111:1515–1523.
- 46 Lam LT, Wright G, Davis RE, *et al*. Cooperative signaling through the signal transducer and activator of transcription 3 and nuclear factor- κ B pathways in subtypes of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2008;111:3701–3713.
- 47 Gupta M, Maurer MJ, Wellik LE, *et al*. Expression of Myc but not pSTAT3, is an adverse prognostic factor for diffuse large cell lymphoma treated with epratuzumab/R-CHOP. *Blood* 2012;120:4400–4406.
- 48 Wu ZL, Song YQ, Shi YF, *et al*. High nuclear expression of STAT3 is associated with unfavorable prognosis in diffuse large B-cell lymphoma. *J Hematol Oncol* 2011;4:31.
- 49 Scuto A, Kujawski M, Kowolik C, *et al*. STAT3 inhibition is a therapeutic strategy for ABC-like diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer Res* 2011;71:3182–3188.
- 50 Klein U, la-Favera R. Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. *Nat Rev Immunol* 2008;8:22–33.
- 51 Reimold AM, Iwakoshi NN, Manis J, *et al*. Plasma cell differentiation requires the transcription factor XBP-1. *Nature* 2001;412:300–307.
- 52 Balague O, Mozos A, Martinez D, *et al*. Activation of the endoplasmic reticulum stress-associated transcription factor χ box-binding protein-1 occurs in a subset of normal germinal-center B cells and in aggressive B-cell lymphomas with prognostic implications. *Am J Pathol* 2009;174:2337–2346.
- 53 Montes-Moreno S, Gonzalez-Medina AR, Rodriguez-Pinilla SM, *et al*. Aggressive large B-cell lymphoma with plasma cell differentiation: immunohistochemical characterization of plasmablastic lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma with partial plasmablastic phenotype. *Haematologica* 2010;95:1342–1349.
- 54 Lin Y, Wong K, Calame K. Repression of c-myc transcription by Blimp-1, an inducer of terminal B cell differentiation. *Science* 1997;276:596–599.
- 55 Raetz EA, Perkins SL, Carlson MA, *et al*. The nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase fusion protein induces c-Myc expression in pediatric anaplastic large cell lymphomas. *Am J Pathol* 2002;161:875–883.
- 56 Han SS, Yun H, Son DJ, *et al*. NF- κ B/STAT3/PI3K signaling crosstalk in iMyc E mu B lymphoma. *Mol Cancer* 2010;9:97.
- 57 Sarosiek KA, Malumbres R, Nechushtan H, *et al*. Novel IL-21 signaling pathway up-regulates c-Myc and induces apoptosis of diffuse large B-cell lymphomas. *Blood* 2010;115:570–580.

Discussió

En el **primer treball** de la tesi hem analitzat l'impacte clínic de les alteracions genètiques i de l'expressió proteica de *MYC* en una sèrie llarga de pacients amb DLBCL tractats amb immunoquimioteràpia. Mitjançant la tècnica de FISH, hem observat que els canvis que implicaven a *MYC*, i també els canvis que succeïen a *BCL2*, *BCL6* i *MALT1*, eren alteracions que es donaven a la majoria de les cèl·lules tumorals, independentment del tipus d'anomalia. Varem detectar alteracions genètiques de *MYC* i de la seva expressió proteica en un 41% dels casos (18% i 43%, respectivament). La incidència d'alteracions genètiques és similar a les publicades en altres sèries utilitzant els mateixos mètodes de detecció (Akyurek N et al., 2012; Copie-Bergman C et al., 2009; Foot NJ et al., 2011; Green TM, Young KH et al., 2012; Horn H et al., 2013).

Dotze (7%) casos van presentar reordenament de *MYC*, la meitat del quals (58%) tenien reordenaments addicionals de *BCL2* i/o *BCL6*. Aquestes troballes són coincidents amb estudis previs de FISH que mostren que un 40-80% dels casos de DLBCL amb reordenament de *MYC* presenten reordenaments simultanis de *BCL2* i/o *BCL6*. Estudis amb citogenètica convencional també han demostrat que les alteracions genètiques de *MYC* estan normalment associades amb canvis cromosòmics addicionals en aquests tumors (Salaverria I et al., 2011).

Els casos amb *MYC* "single-hit" i els casos amb *MYC* "double/triple-hit" presentaven un comportament similar respecte a la supervivència. Aquestes troballes suggereixen que el reordenament de *MYC* com a única alteració genètica no hauria de ser infraestimat, sobretot quan aquest reordenament està acompanyat d'una elevada expressió proteica de l'oncogen. Tot i així, sembla evident que els reordenaments de *BCL2* i/o *BCL6* acompanyants aporten un empitjorament al comportament dels reordenaments de *MYC*. Green TM i col·laboradors varen estudiar 191 casos de DLBCL mitjançant la tècnica de FISH per *MYC* i *BCL2*, així com l'expressió proteica d'aquests marcadors per immunohistoquímica (Green TM, Young KH et al., 2012). Un cop exclosos els limfomes amb doble reordenament, no van trobar un impacte significatiu dels reordenaments de *MYC* en la supervivència dels pacients. De manera similar, Johnson NA i col·laboradors varen observar un impacte molt desfavorable dels reordenaments de *MYC* només quan aquests casos estaven acompanyats per reordenaments o sobreexpressió proteica de *BCL2* (Johnson NA et al., 2012). Les diferències entre els estudis previs publicats i el nostre podrien ser degudes al baix nombre de casos que presentaven *MYC* "single-hit".

La incidència de guanys de *MYC* fou observada en un 19% dels casos i les amplificacions en un 2%. Els pacients amb guanys del gen han presentat característiques clíniques similars a les del DLBCL sense alteracions detectables de *MYC*. Els guanys s'associaven amb alteracions genètiques addicionals en els altres gens estudiats i només el 13% dels casos presentaven els guanys de *MYC* com a única alteració. En el nostre estudi, hem considerat la presència de 3 o 4 còpies com a guanys, i més de 4 còpies com amplificacions i amb aquestes aproximacions hem identificat un petit grup de pacients amb amplificacions de *MYC* que presentaven un pronòstic molt desfavorable similar al dels pacients amb *MYC* "double/triple-hit". Mossafa i col·laboradors també han publicat les amplificacions de

MYC com una alteració desfavorable en un grup de limfomes B d'alt grau que incloïen 12 limfomes de cèl·lula B de baix grau transformats i 3 DLBCL (Mossafa H et al., 2006).

L'expressió proteica de *MYC* en els DLBCLs del nostre estudi es va detectar en 81/168 (48%) dels casos. La presència del reordenament de *MYC* es va correlacionar amb l'expressió proteica de *MYC*, tal i com havien trobat altres treballs previs al nostre utilitzant el mateix anticòs (Green TM et al., 2012; Tapia G et al., 2011). A més a més, l'expressió proteica de *MYC* va identificar un subgrup de tumors (19%) amb nivells d'expressió per sobre del 30% que no presentaven cap alteració genètica de *MYC*, indicant que podrien existir altres mecanismes a més de les alteracions genètiques descrites que causessin aquesta sobreexpressió proteica (Green TM et al., 2012; Horn H et al., 2013; Kluk MJ et al., 2012; Tapia G et al., 2011).

L'elevada expressió proteica de *MYC* té un impacte pronòstic desfavorable en els pacients amb DLBCL. El punt de tall establert mitjançant un sistema d'anàlisi digital va ser del 10%. Aquest lliindar era el que millor copsava l'impacte desfavorable de les alteracions de *MYC* en la nostra sèrie i mantenia l'impacte pronòstic en l'anàlisi multivariat en models que incloïen l'IPI. Tres estudis recents han evaluat l'impacte de l'expressió proteica de *MYC* en DLBCL tractats amb R-CHOP. Cal destacar però, que en els tres estudis es va fer servir un punt de tall del 40%, i només en un dels estudis l'expressió proteica de *MYC* aconseguia un impacte pronòstic significatiu en l'anàlisi univariat (Green TM, Young KH et al., 2012; Horn H et al., 2013; Johnson NA et al., 2012).

Per altra banda, l'impacte de la coexpressió de *MYC* i *BCL2* també ha estat evaluada en aquests estudis previs. Green TM i Horn H varen descriure uns criteris de predicció de la supervivència observant que els criteris que englobaven als casos de coexpressió de *MYC* i *BCL2* presentaven un pronòstic desfavorable (Green TM, Young KH et al., 2012; Horn H et al., 2013). Johnson NA per la seva banda també va trobar que els casos amb simultània coexpressió d'aquests dos marcadors presentaven una inferior supervivència global i progressió lliure de malaltia. En el nostre treball hem realitzat els mateixos estudis i hem obtingut resultats similars, la qual cosa emfatitza l'impacte de l'expressió proteica de *MYC* i *BCL2* en el DLBCL. Tot i així, cap dels estudis previs ha fet servir el mateix punt de tall per *BCL2*. Alternativament, en el nostre estudi, els casos que sobreexpressaven *MYC* encara que no expressessin *BCL2*, mantenien el pronòstic desfavorable. Aquesta diferència podria ser atribuïda a les diferents estratègies metodològiques utilitzades per evaluar la sobreexpressió de *MYC* i *BCL2*.

En el **segon treball** de la tesi hem estudiat les alteracions genètiques de *MYC*, *BCL2*, *BCL6*, *MALT1*, *PAX5* i *IGH* en una sèrie de PBLs. Varem identificar que el reordenament de *MYC* és l'anomalia estructural cromosòmica més freqüent en els PBLs. Aquest reordenament es dona en quasi el 50% dels casos i les parelles de *MYC* en aquestes translocacions solen ser els gens de les *IGs* en la majoria de tumors (85%). Aquestes troballes concorden amb les primeres observacions del reordenament de *MYC* obtingudes en casos aïllats de PBL on es descriu la incidència del reordenament (Chuah KL et al., 2009; Dawson MA et al., 2007; Yotsumoto M et al., 2009; Bogusz AM et al., 2009; Taddesse-Heath L et al., 2010).

A més dels reordenaments de *MYC*, els PBLs presentaven de manera freqüent guanys dels altres gens estudiats (*BCL2*, *BCL6*, *MALT1*, *PAX5* i *IGH*), en un 30% dels casos es van detectar guanys de 3 o més d'aquests gens. Cap dels nostres casos de PBL va mostrar reordenaments de *BCL2* o *BCL6*, que són els gens que fins ara s'han implicat en la patogènesi del DLBCL més freqüentment.

El PBL que presenta reordenament de *MYC* mostra diferències significatives respecte d'altres tumors que presenten el mateix reordenament. En el BL, com s'ha descrit amb anterioritat, el reordenament de *MYC* es troba en una pràctica totalitat dels casos i la seva parella de translocació acostuma a ser un gen de les *IGs*, normalment el gen de les *IGH*. Aquest reordenament és l'única anomalia genètica o pot estar associat a un cariotip simple. De manera contrària, el reordenament de *MYC* en el DLBCL ocorre entre el 4% i el 10% dels casos, éssent la parella de la translocació un gen diferent als gens de les *IGs* en un 40% dels tumors, i a més, normalment aquest reordenament sol estar associat d'un cariotip complex (Hummel M et al., 2006; Salaverria I et al., 2008). Els reordenaments de *MYC* també estan associats als reordenaments de *BCL2* o de *BCL6* i a la presència de cariotips molt complexos (Hummel M et al., 2006; Salaverria I et al., 2008; Snuderl M et al., 2010). En el PBL, la presència del reordenament de *MYC* és relativament freqüent (50%), la parella més comuna del reordenament és un gen de les *IGs*, està associada a un cariotip complex, tot i que sense presentar "double-hits", i aquest reordenament succeeix en un limfoma amb un fenotipus de cèl·lula B terminal. En el mieloma de cèl·lula plasmàtica (MM) s'ha detectat la presència del reordenament de *MYC* fins a un 15% dels casos, però aquesta presència es pot veure incrementada fins a un 45% en els casos de MM avançat i en el 65% de les línies cel·lulars de MM, suggerint que aquest reordenament pot ser una alteració adquirida associada a la progressió de la malaltia. El PBL, sobretot la variant plasmacítica, té característiques morfològiques i immunofenotípiques que es solapen amb les transformacions plasmablàstiques extramedul·lars de les neoplàsies de cèl·lula plasmàtica. La diferència entre el MM i els PBLs a nivell del reordenament de *MYC* s'escau en que al voltant d'un 40% d'aquests reordenaments de *MYC* no impliquen els gens de les *IGs* en el MM, i en canvi en els PBLs és freqüent la troballa de la translocació *IG/MYC*. Tot i així, pel que fa al gen *IGH* en el MM sol ser la parella d'altres gens diferents a *MYC* (per exemple: *CCND1*, *FGFR3*, *CCND3*, *MAF*), mentre que en els PBLs el reordenament del gen de les *IGH* succeeix quasi exclusivament amb *MYC* (Gabrea A et al., 2006; Gabrea et al., 2008). Aquestes darreres troballes sembla que ens podrien servir per a diferenciar el PBL del MM.

L'alta freqüència de translocacions *IG/MYC* en els PBLs suggereix que l'activació de *MYC* deu jugar un paper important en la patogènesi d'aquests tumors. La majoria de limfomes amb reordenament de *MYC* tenen un fenotipus de cèl·lula B de centre germinal, mentre que en els PBLs l'activació d'aquest gen succeeix en el context d'un estadi de diferenciació terminal de la cèl·lula B. Un dels reguladors més importants de la diferenciació a cèl·lula plasmàtica és el factor de transcripció BLIMP1, el qual es troba altament expressat en els PBLs (Balagué O et al., 2007; García JF et al., 2006; Montes-Moreno S et al., 2010). BLIMP1 reprimeix els gens encarregats de mantenir la identitat de la cèl·lula B madura com *PAX5*, i promou l'expressió de

gens com XBP1 implicats en el programa de diferenciació de cèl·lula plasmàtica. BLIMP1 també reprimeix aquells gens que estan implicats en la proliferació i el creixement cel·lular com l'oncogen *MYC* (Lin Y et al., 1997). La recurrent incidència del reordenament de *MYC* en el PBL podria ser un mecanisme oncogènic que superés l'efecte repressor de BLIMP1 sobre l'expressió de *MYC*.

No es varen identificar diferències significatives entre les alteracions genètiques trobades i la supervivència dels pacients. Malgrat tot, cal destacar que alguns dels nostres pacients que presentaven una llarga supervivència no tenien o tenien molts pocs guanys en els gens estudiats. Encara que la descripció inicial del PBL subratlla el comportament agressiu i el pronòstic desfavorable dels pacients, algunes publicacions han descrit una supervivència més llarga, similar a l'obtinguda amb els nostres casos. Aquesta millora en la supervivència ha estat associada als nous tractaments antiretrovirals, a un estatus immunològic millor dels pacients, i en les millores en les atencions de suport als malalts.

En el **tercer treball** de la present tesi hem estudiat les alteracions genètiques i proteiques de *MYC* i l'expressió de pSTAT3 en una sèrie d'ALK+ LBCLs. Les vies oncogèniques implicades en la patogènesi dels limfomes ALK+ LBCL no estan encara ben definides. Els reordenaments d'*ALK* produeixen proteïnes de fusió amb activitat tirosina quinasa constitutiva, la qual activa diferents vies. Una d'aquestes vies activades és la via de senyalització d'STAT3, la qual sembla ser que és una via implicada en la limfomagènesi mediada per ALK segons diferents estudis realitzats amb models de cèl·lules B i T humanes i de ratolins (Chiarle R et al., 2005; Zamo A et al., 2002; Barreca A et al., 2011). Estudis de línies cel·lulars derivades d'aquests tumors demostren que els nivells d'expressió d'STAT3 disminueixen quan aquestes línies es sotmeten als efectes d'un inhibidor d'ALK, posant en evidència la rellevància d'STAT3 en els ALK+ LBCL (Cerchiatti L et al., 2011; Van Roosbroeck K et al., 2010). Les nostres troballes demostren que l'activació d'STAT3 a través de la seva forma fosforilada està fortament expressada en tots els ALK+ LBCLs, expandint la identificació prèvia de pSTAT3 en dos ALK+ LBCL (Momose S et al., 2009) i suggerint que aquesta via podria ser important en la patogènesi d'aquests limfomes. La forta i constant expressió de pSTAT3 en els ALK+ LBCLs contrastava amb la seva més baixa expressió en "non-GCB" DLBCL (36%) i en la seva lleugera disminució respecte els PBLs (67%). STAT3 no ha estat prèviament estudiat en els PBLs i les nostres troballes suggereixen que aquesta via podria ésser també rellevant en aquests tumors. L'expressió de pSTAT3 observada en el nostre subgrup de "non-GCB" DLBCL és similar a la freqüència observada en altres estudis previs (Ding BB et al., 2008; Lam LT et al., 2008). Tot i que el significat pronòstic d'aquesta troballa en DLBCL és controvertit (Gupta M et al., 2012; Wu ZL et al., 2011), els estudis realitzats en línies cel·lulars i models animals suggereixen que STAT3 podria ser una diana terapèutica rellevant en aquest subgrup de DLBCL (Ding BB et al., 2008; Lam LT et al., 2008; Scuto A et al., 2011).

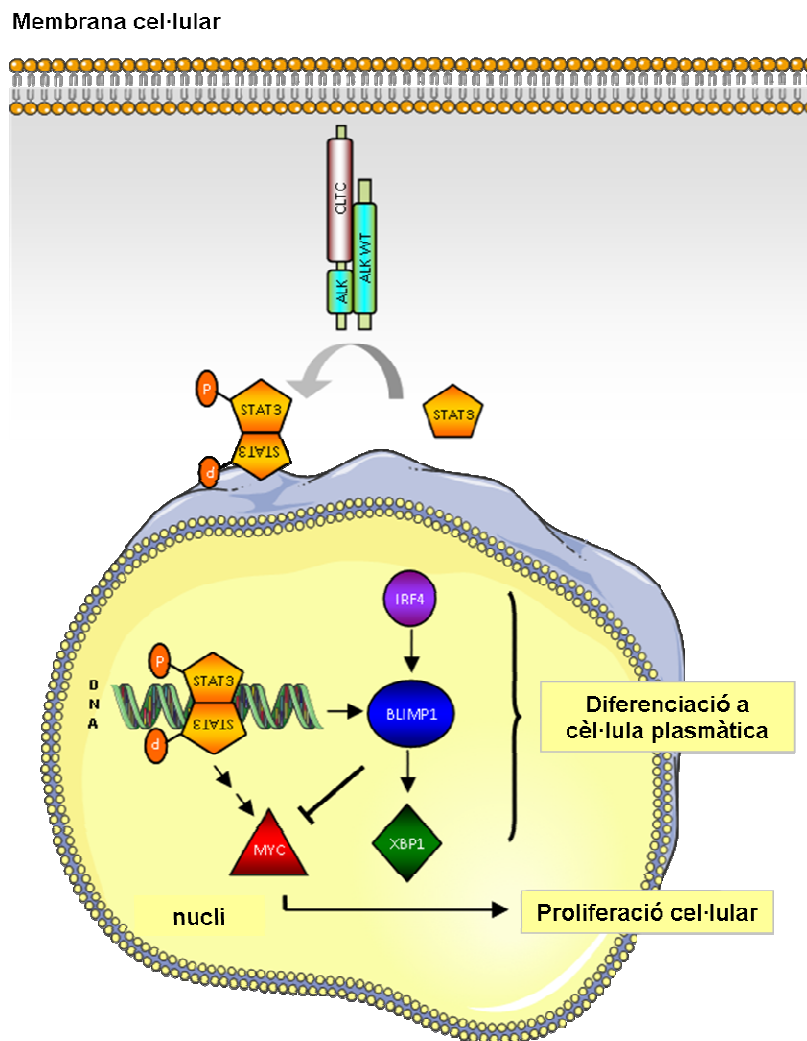
STAT3 promou la regulació de BLIMP1, un dels reguladors més importants del programa de diferenciació a cèl·lula plasmàtica (Diehl SA et al., 2008); així doncs, l'elevada expressió de pSTAT3 en ALK+ LBCL podria ser rellevant per el fenotip plasmablàstic d'aquests tumors. Conjuntament amb el paper del pSTAT3, en aquest treball hem demostrat que els

ALK+ LBCL constantment expressen BLIMP1 i que aquest sembla ser funcional ja que aquests tumors careixen d'expressió de PAX5 i en canvi expressen XBP1, dos gens, que respectivament, són reprimits i regulats per BLIMP1. PAX5 és essencial per al manteniment de la cèl·lula B madura i la seva repressió és necessària per al desenvolupament del programa de diferenciació de la cèl·lula plasmàtica, mentre que XBP1 és un factor de transcripció important que modula el programa de diferenciació terminal de la cèl·lula B (Klein U et al., 2008; Reimold AM et al., 2001). Aquest fenotip plasmablàstic complet observat en els ALK+ LBCL és més comú que en els PBLs. Els PBLs expressen de manera constant BLIMP1 en pràcticament tots els casos, però XBP1 només s'expressa en aproximadament un 50% d'ells (Balagué O et al., 2009; Montes-Moreno S et al., 2010).

De manera contrària als PBLs, els ALK+ LBCLs no presenten reordenaments de *MYC*. La meitat dels casos estudiats presenten augment en el nombre de còpies: majoritàriament guanys, excepte un cas amb amplificacions. Tot i la baixa incidència de nombre d'alteracions genètiques de *MYC*, l'expressió proteica de l'oncogen es va observar en tots els casos d'ALK+ LBCL, suggerint que aquesta expressió podria ser important per a la patogènesi d'aquests tumors. Estudis previs han demostrat que *MYC* està per sota d'ALK en les vies de senyalització (Raetz EA et al., 2002) i que també podria ser una diana de la forma activada d'STAT3 (Han SS et al., 2010; Sarosiek KA et al., 2010). Per tant, l'expressió de *MYC* en ALK+ LBCL podria ser dirigida per aquests mecanismes alternatius que, tal com es varen postular pels PBLs, podrien superar l'efecte repressor de BLIMP1 sobre *MYC*.

Aquestes troballes es podrien exemplificar en el següent model: el producte del receptor d'ALK reordenat s'uniria a la forma no reordenada, la qual cosa permetria la formació d'un homodimer d'STAT3 sense la necessitat d'un lligand extern. La dimerització d'STAT3 donaria lloc a l'autofosforilació dels seus residus de tirosina. Aquesta activació permetria l'entrada del dimer d'STAT3 en el nucli de la cèl·lula, on promouria l'activació de BLIMP1, el qual juntament amb IRF4 i XBP1 donarien lloc a la diferenciació de la cèl·lula B cap a cèl·lula plasmàtica, i també a l'activació de *MYC* promovent la proliferació cel·lular (veure figura 16). La rellevància de la via ALK/STAT3 en la patogènesi d'aquests limfomes podria oferir una diana atractiva per a noves teràpies.

Figura 16. Model d'activació d' STAT3 i expressió de BLIMP1 i MYC en els ALK+ LBCLs.



Conclusions

- 1.- El reordenament de *MYC* es detecta en un subgrup de casos de DLBCL (7%) i freqüentment està acompanyat de reordenaments addicionals de *BCL2* i/o *BCL6*. L'impacte pronòstic de la supervivència dels casos amb *MYC* "single-hit" i dels casos amb *MYC* "double/triple-hit" és similar i desfavorable per ambdós subgrups de pacients tractats amb R-CHOP (**Treball 1**).
- 2.- Els guanys de *MYC* es presenten aproximadament en un 20% dels casos amb DLBCL i no confereixen una menor supervivència global. Les amplificacions de *MYC* es presenten en un baix percentatge de pacients (2%) però permeten identificar un subgrup de pacients amb un mal pronòstic (**Treball 1**).
- 3.- *MYC* s'expressa a nivell proteic en aproximadament un 50% dels DLBCLs i s'associa a un pronòstic desfavorable (**Treball 1**).
- 4.- La sobreexpressió es correlaciona els reordenaments de *MYC* però també apareix en un subgrup de casos sense alteracions en el gen. L'anàlisi proteic per immunohistoquímica de *MYC* és un bon mètode de cribatge per a la detecció dels casos amb mal pronòstic. L'estudi simultani de l'expressió de *BCL2* detecta un subgrup de casos amb el pitjor pronòstic (**Treball 1**).
- 5.- El reordenament de *MYC* és l'alteració cromosòmica més freqüent trobada en els PBLs. Aquest reordenament es dona en quasi un 50% dels casos, suggerint que aquest fet podria jugar un paper important en la patogènesi d'aquests tumors (**Treball 2**).
- 6.- *MYC* es reordena amb els gens de les *IGs* en un context de cariotip complex en la majoria de PBLs. La presència del reordenament de *MYC* tendeix a observar-se en aquells casos amb positivitat per EBV i en aquells tumors amb una morfologia monomòrfica (**Treball 2**).
- 7.- *BCL2*, *BCL6*, *MALT1* i *PAX5* són gens que solen estar guanyats però no reordenats en els PBLs. Aquests guanys tendeixen a ser més freqüents en tumors amb diferenciació plasmacítica que en la variant monomòrfica (**Treball 2**).
- 8.- La forma activada d'STAT3 (pSTAT3) està altament expressada en els ALK+ LBCLs suggerint que la via d'STAT3 pot ser important en la patogènesi d'aquests limfomes (**Treball 3**).
- 9.- *MYC* s'expressa en els ALK+ LBCLs malgrat la manca del reordenament del gen. Aquesta sobreexpressió proteica suggereix que *MYC* podria tenir un paper rellevant per a la patogènesi del tumor (**Treball 3**).
- 10.- El reordenament d'*ALK* activa STAT3 el qual desenvolupa dues funcions en els ALK+ LBCL: promoure el programa de diferenciació de cèl·lula plasmàtica a través de BLIMP1, i sobreactivar l'expressió de *MYC* (**Treball 3**).

Bibliografia

- Adam P, Katzenberger T, Seeberger H, Gattenlöhner S, Wolf J, Steinlein C, Schmid M, Müller-Hermelink HK, Ott G. A case of a diffuse large B-cell lymphoma of plasmablastic type associated with the t(2;5)(p23;q35) chromosome translocation. *American Journal of Surgical Pathology* 2003; 27(11):1473-6.
- Akyurek N, Uner A, Benekli M, Barista I. Prognostic significance of MYC, BCL2, and BCL6 rearrangements in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone plus rituximab. *Cancer* 2012; 118(17):4173-83.
- Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, Boldrick JC, Sabet H, Tran T, Yu X, Powell JI, Yang L, Marti GE, Moore T, Hudson J Jr, Lu L, Lewis DB, Tibshirani R, Sherlock G, Chan WC, Greiner TC, Weisenburger DD, Armitage JO, Warnke R, Levy R, Wilson W, Grever MR, Byrd JC, Botstein D, Brown PO, Staudt LM. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*. 2000 Feb 3;403(6769):503-11.
- Albert T, Urlbauer B, Kohlhuber F, Hammersen B, Eick D. Ongoing mutations in the N-terminal domain of c-Myc affect transactivation in Burkitt's lymphoma cell lines. *Oncogene* 1994; 9(3):759-63.
- Armitage JO, Weisenburger DD. New approach to classifying non-Hodgkin's lymphomas: clinical features of the major histologic subtypes. Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *Journal of Clinical Oncology* 1998; 16(8):2780-95.
- Au WY, Horsman DE, Gascoyne RD, Viswanatha DS, Klasa RJ, Connors JM. The spectrum of lymphoma with 8q24 aberrations: a clinical, pathological and cytogenetic study of 87 consecutive cases. *Leukemia and Lymphoma* 2004; 45(3):519-28.
- Balagué O, Martínez A, Colomo L, Roselló E, Garcia A, Martínez-Bernal M, Palacín A, Fu K, Weisenburger D, Colomer D, Burke JS, Warnke RA, Campo E. Epstein-Barr virus negative clonal plasma cell proliferations and lymphomas in peripheral T-cell lymphomas: a phenomenon with distinctive clinicopathologic features. *American Journal of Surgical Pathology* 2007; 31(9):1310-22.
- Balagué O, Mozos A, Martinez D, Hernandez L, Colomo L, Mate JL, Teruya-Feldstein J, Lin O, Campo E, Lopez-Guillermo A, Martinez A. Activation of the endoplasmic reticulum stress-associated transcription factor x box-binding protein-1 occurs in a subset of normal germinal-center B cells and in aggressive B-cell lymphomas with prognostic implications. *American Journal of Pathology* 2009; 174(6):2337-46.

- Barrans SL, Crouch S, Smith A, Turner K, Owen R, Patmore R, Roman E, Jack A. Rearrangement of MYC is associated with poor prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated in the era of rituximab. *Journal of Clinical Oncology* 2010; 28(20):3360-5.
- Barrans SL, Evans PA, O'Connor SJ, Kendall SJ, Owen RG, Haynes AP, Morgan GJ, Jack AS. The t(14;18) is associated with germinal center-derived diffuse large B-cell lymphoma and is a strong predictor of outcome. *Clinical Cancer Research* 2003; 9(6):2133-9.
- Barrans SL, O'Connor SJ, Evans PA, Davies FE, Owen RG, Haynes AP, Morgan GJ, Jack AS. Rearrangement of the BCL6 locus at 3q27 is an independent poor prognostic factor in nodal diffuse large B-cell lymphoma. *British Journal of haematology* 2002; 117(2):322-32.
- Barreca A, Lasorsa E, Riera L, Machiorlatti R, Piva R, Ponzoni M, Kwee I, Bertoni F, Piccaluga PP, Pileri SA, Inghirami G; European T-Cell Lymphoma Study Group. Anaplastic lymphoma kinase in human cancer. *Journal of Molecular Endocrinology* 2011; 47(1):R11-23.
- Boerma EG, van Imhoff GW, Appel IM, Veeger NJ, Kluin PM, Kluin-Nelemans JC. Gender and age-related differences in Burkitt lymphoma--epidemiological and clinical data from The Netherlands. *European Journal of Cancer* 2004; 40(18):2781-7.
- Bogusz AM, Seegmiller AC, Garcia R, Shang P, Ashfaq R, Chen W. Plasmablastic lymphomas with MYC/IgH rearrangement: report of three cases and review of the literature. *American Journal of Clinical Pathology* 2009; 132(4):597-605.
- Bubała H, Małydyk J, Włodarska I, Sońta-Jakimczyk D, Szczepański T. ALK-positive diffuse large B-cell lymphoma. *Pediatric blood and cancer* 2006; 46(5):649-53
- Burkitt D. A sarcoma involving the jaws in African children. *British Journal of Surgery* 1958; 46(197):218-23.
- Calado DP, Sasaki Y, Godinho SA, Pellerin A, Köchert K, Sleckman BP, de Alborán IM, Janz M, Rodig S, Rajewsky K. The cell-cycle regulator c-Myc is essential for the formation and maintenance of germinal centers. *Nature Immunology* 2012; 13(11):1092-100.

- Campbell J, Seymour JF, Matthews J, Wolf M, Stone J, Juneja S. The prognostic impact of bone marrow involvement in patients with diffuse large cell lymphoma varies according to the degree of infiltration and presence of discordant marrow involvement. *Eur J Haematol.* 2006 Jun;76(6):473-80.
- Cario G, Stadt UZ, Reiter A, Welte K, Sykora KW. Variant translocations in sporadic Burkitt's lymphoma detected in fresh tumour material: analysis of three cases. *British Journal of Haematology* 2000; 110(3):537-46.
- Cerchiatti L, Damm-Welk C, Vater I, Klapper W, Harder L, Pott C, Yang SN, Reiter A, Siebert R, Melnick A, Woessmann W. Inhibition of anaplastic lymphoma kinase (ALK) activity provides a therapeutic approach for CLTC-ALK-positive human diffuse large B cell lymphomas. *Plos One* 2011; 6(4):e18436.
- Chang CC, Zhou X, Taylor JJ, Huang WT, Ren X, Monzon F, Feng Y, Rao PH, Lu XY, Fabio F, Hilsenbeck S, Creighton CJ, Jaffe ES, Lau CC. Genomic profiling of plasmablastic lymphoma using array comparative genomic hybridization (aCGH): revealing significant overlapping genomic lesions with diffuse large B-cell lymphoma. *Journal of haematology and Oncology* 2009;2:47.
- Chiarle R, Simmons WJ, Cai H, Dhall G, Zamo A, Raz R, Karras JG, Levy DE, Inghirami G. Stat3 is required for ALK-mediated lymphomagenesis and provides a possible therapeutic target. *Nature Medicine* 2005; 11(6):623-9.
- Chikatsu N, Kojima H, Suzukawa K, Shinagawa A, Nagasawa T, Ozawa H, Yamashita Y, Mori N. ALK+, CD30-, CD20- large B-cell lymphoma containing anaplastic lymphoma kinase (ALK) fused to clathrin heavy chain gene (CLTC). *Modern Pathology* 2003; 16(8):828-32.
- Chuah KL, Ng SB, Poon L, Yap WM. Plasmablastic lymphoma affecting the lung and bone marrow with CD10 expression and t(8;14)(q24;q32) translocation. *International Journal of Surgical Pathology* 2009; 17(2):163-6.
- Colomo L, López-Guillermo A, Perales M, Rives S, Martínez 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 Jan 1;101(1):78-84.
- Colomo L, Loong F, Rives S, Pittaluga S, Martínez A, López-Guillermo A, Ojanguren J, Romagosa V, Jaffe ES, Campo E. Diffuse large B-cell lymphomas with plasmablastic

differentiation represent a heterogeneous group of disease entities. *American Journal of Surgical Pathology* 2004; 28(6):736-47

Copie-Bergman C, Gaulard P, Leroy K, Briere J, Baia M, Jais JP, Salles GA, Berger F, Haioun C, Tilly H, Emile JF, Banham AH, Mounier N, Gisselbrecht C, Feugier P, Coiffier B, Molina TJ. Immuno-fluorescence in situ hybridization index predicts survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP: a GELA study. *Journal of Clinical Oncology* 2009; 27(33):5573-9.

Dalla-Favera R, Bregni M, Erikson J, Patterson D, Gallo RC, Croce CM. Human c-myc onc gene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America* 1982; 79(24):7824-7.

Dang CV. MYC on the path to cancer. *Cell* 2012; 149(1):22-35.

Dave SS, Fu K, Wright GW, Lam LT, Kluin P, Boerma EJ, Greiner TC, Weisenburger DD, Rosenwald A, Ott G, Müller-Hermelink HK, Gascoyne RD, Delabie J, Rimsza LM, Braziel RM, Grogan TM, Campo E, Jaffe ES, Dave BJ, Sanger W, Bast M, Vose JM, Armitage JO, Connors JM, Smeland EB, Kvaloy S, Holte H, Fisher RI, Miller TP, Montserrat E, Wilson WH, Bahl M, Zhao H, Yang L, Powell J, Simon R, Chan WC, Staudt LM; Lymphoma/Leukemia Molecular Profiling Project. Molecular diagnosis of Burkitt's lymphoma. *New England Journal of Medicine* 2006; 354(23):2431-42.

Dawson MA, Schwarzer AP, McLean C, Oei P, Campbell LJ, Wright E, Shortt J, Street AM. AIDS-related plasmablastic lymphoma of the oral cavity associated with an IGH/MYC translocation--treatment with autologous stem-cell transplantation in a patient with severe haemophilia-A. *Haematologica* 2007; 92(1):e11-2.

Delecluse HJ, Anagnostopoulos I, Dallenbach F, Hummel M, Marafioti T, Schneider U, Huhn D, Schmidt-Westhausen A, Reichart PA, Gross U, Stein H. Plasmablastic lymphomas of the oral cavity: a new entity associated with the human immunodeficiency virus infection. *Blood* 1997; 89(4):1413-20.

Delsol G, Lamant L, Mariamé B, Pulford K, Dastugue N, Brousset P, Rigal-Huguet F, al Saati T, Cerretti DP, Morris SW, Mason DY. A new subtype of large B-cell lymphoma expressing the ALK kinase and lacking the 2; 5 translocation. *Blood* 1997; 89(5):1483-90.

De Paepe P, Achten R, Verhoef G, Wlodarska I, Stul M, Vanhentenrijk V, Praet M, De Wolf-Peeters C. Large cleaved and immunoblastic lymphoma may represent two distinct

- clinicopathologic entities within the group of diffuse large B-cell lymphomas. *Journal of Clinical Oncology* 2005; 23(28):7060-8.
- De Paepe P, Baens M, van Krieken H, Verhasselt B, Stul M, Simons A, Poppe B, Laureys G, Brons P, Vandenberghe P, Speleman F, Praet M, De Wolf-Peeters C, Marynen P, Wlodarska I. ALK activation by the CLTC-ALK fusion is a recurrent event in large B-cell lymphoma. *Blood* 2003; 102(7):2638-41.
- De Souza MT, Mkrtychyan H, Hassan R, Ney-Garcia DR, de Azevedo AM, da Costa ES, de Figueiredo AF, Liehr T, Abdelhay E, Silva ML. Secondary abnormalities involving 1q or 13q and poor outcome in high stage Burkitt leukemia/lymphoma cases with 8q24 rearrangement at diagnosis. *International Journal of Hematology* 2011; 93(2):232-6.
- Diehl SA, Schmidlin H, Nagasawa M, van Haren SD, Kwakkenbos MJ, Yasuda E, Beaumont T, Scheeren FA, Spits H. STAT3-mediated up-regulation of BLIMP1 is coordinated with BCL6 down-regulation to control human plasma cell differentiation. *Journal of Immunology* 2008; 180(7):4805-15.
- Ding BB, Yu JJ, Yu RY, Mendez LM, Shaknovich R, Zhang Y, Cattoretti G, Ye BH. Constitutively activated STAT3 promotes cell proliferation and survival in the activated B-cell subtype of diffuse large B-cell lymphomas. *Blood* 2008; 111(3):1515-23.
- Dominguez-Sola D, Vitorica GD, Ying CY, Phan RT, Saito M, Nussenzweig MC, Dalla-Favera R. The proto-oncogene MYC is required for selection in the germinal center and cyclic reentry. *Nature Immunology* 2012; 13(11):1083-91.
- Douglas NC, Jacobs H, Bothwell AL, Hayday AC. Defining the specific physiological requirements for c-Myc in T cell development. *Nature Immunology* 2001; 2(4):307-15.
- Einerson RR, Law ME, Blair HE, Kurtin PJ, McClure RF, Ketterling RP, Flynn HC, Dogan A, Remstein ED. Novel FISH probes designed to detect IGK-MYC and IGL-MYC rearrangements in B-cell lineage malignancy identify a new breakpoint cluster region designated BVR2. *Leukemia* 2006; 20(10):1790-9.
- Engelhard M, Brittinger G, Huhn D, Gerhartz HH, Meusers P, Siegert W, Thiel E, Wilmanns W, Aydemir U, Bierwolf S, Griesser H, Tiemann M, Lennert K. Subclassification of diffuse large B-cell lymphomas according to the Kiel classification: distinction of centroblastic and immunoblastic lymphomas is a significant prognostic risk factor. *Blood* 1997; 89(7):2291-97.

- Foot NJ, Dunn RG, Geoghegan H, Wilkins BS, Neat MJ. Fluorescence in situ hybridisation analysis of formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections in the diagnostic work-up of non-Burkitt high grade B-cell non-Hodgkin's lymphoma: a single centre's experience. *Journal of Clinical Pathology* 2011; 64(9):802-8.
- Gabrea A, Leif Bergsagel P, Michael Kuehl W. Distinguishing primary and secondary translocations in multiple myeloma. *DNA Repair* 2006; 5(9-10):1225-33.
- Gabrea A, Martelli ML, Qi Y, Roschke A, Barlogie B, Shaughnessy JD Jr, Sawyer JR, Kuehl WM. Secondary genomic rearrangements involving immunoglobulin or MYC loci show similar prevalences in hyperdiploid and nonhyperdiploid myeloma tumors. *Genes, Chromosomes and Cancer* 2008; 47(7):573-90.
- García JF, Roncador G, García JF, Sáenz AI, Maestre L, Lucas E, Montes-Moreno S, Fernandez Victoria R, Martínez-Torrecuadrara JL, Marafioti T, Mason DY, Piris MA. PRDM1/BLIMP-1 expression in multiple B and T-cell lymphoma. *Haematologica* 2006; 91(4):467-74.
- Gascoyne RD, Adomat SA, Krajewski S, Krajewska M, Horsman DE, Tolcher AW, O'Reilly SE, Hoskins P, Coldman AJ, Reed JC, Connors JM. Prognostic significance of Bcl-2 protein expression and Bcl-2 gene rearrangement in diffuse aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1997; 90(1):244-51.
- Gascoyne RD, Lamant L, Martin-Subero JI, Lestou VS, Harris NL, Müller-Hermelink HK, Seymour JF, Campbell LJ, Horsman DE, Auvigne I, Espinos E, Siebert R, Delsol G. ALK-positive diffuse large B-cell lymphoma is associated with Clathrin-ALK rearrangements: report of 6 cases. *Blood* 2003; 102(7):2568-73.
- Green TM, Nielsen O, de Stricker K, Xu-Monette ZY, Young KH, Møller MB. High levels of nuclear MYC protein predict the presence of MYC rearrangement in diffuse large B-cell lymphoma. *American Journal of Surgical Pathology* 2012; 36(4):612-9.
- Green TM, Young KH, Visco C, Xu-Monette ZY, Orazi A, Go RS, Nielsen O, Gadeberg OV, Mourits-Andersen T, Frederiksen M, Pedersen LM, Møller MB. Immunohistochemical double-hit score is a strong predictor of outcome in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone. *Journal of Clinical Oncology* 2012; 30(28):3460-7.
- God JM, Haque A. Burkitt lymphoma: pathogenesis and immune evasion. *Journal of Oncology* 2010; pii: 516047.

- Gutiérrez-García G, Cardesa-Salzmann T, Climent F, González-Barca E, Mercadal S, Mate JL, Sancho JM, Arenillas L, Serrano S, Escoda L, Martínez S, Valera A, Martínez A, Jares P, Pinyol M, García-Herrera A, Martínez-Trillos A, Giné E, Villamor N, Campo E, Colomo L, López-Guillermo A; Grup per l'Estudi dels Limfomes de Catalunya i Balears (GELCAB). Gene-expression profiling and not immunophenotypic algorithms predicts prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with immunochemotherapy. *Blood*. 2011;117(18):4836-43.
- Han SS, Yun H, Son DJ, Tompkins VS, Peng L, Chung ST, Kim JS, Park ES, Janz S. NF-kappaB/STAT3/PI3K signaling crosstalk in iMyc E mu B lymphoma. *Molecular Cancer* 2010; 9:97.
- Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, Gascoyne RD, Delabie J, Ott G, Müller-Hermelink HK, Campo E, Braziel RM, Jaffe ES, Pan Z, Farinha P, Smith LM, Falini B, Banham AH, Rosenwald A, Staudt LM, Connors JM, Armitage JO, Chan WC. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood* 2004; 103(1):275-82.
- Haralambieva E, Pulford KA, Lamant L, Pileri S, Roncador G, Gatter KC, Delsol G, Mason DY. Anaplastic large-cell lymphomas of B-cell phenotype are anaplastic lymphoma kinase (ALK) negative and belong to the spectrum of diffuse large B-cell lymphomas. *British Journal of Haematology* 2000; 109(3):584-91.
- Haralambieva E, Schuurin E, Rosati S, van Noesel C, Jansen P, Appel I, Guikema J, Wabinga H, Bleggi-Torres LF, Lam K, van den Berg E, Mellink C, van Zelder-Bhola S, Kluin P. Interphase fluorescence in situ hybridization for detection of 8q24/MYC breakpoints on routine histologic sections: validation in Burkitt lymphomas from three geographic regions. *Genes, Chromosomes and Cancer* 2004; 40(1):10-8
- Harris NL, Jaffe ES, Stein H, Banks PM, Chan JK, Cleary ML, Delsol G, De Wolf-Peeters C, Falini B, Gatter KC. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood* 1994; 18(5):1361-92.
- Henglein B, Synovzik H, Groitl P, Bornkamm GW, Hartl P, Lipp M. Three breakpoints of variant t(2;8) translocations in Burkitt's lymphoma cells fall within a region 140 kilobases distal from c-myc. *Molecular and Cellular Biology* 1989; 9(5):2105-13.
- Hill ME, MacLennan KA, Cunningham DC, Vaughan Hudson B, Burke M, Clarke P, Di Stefano F, Anderson L, Vaughan Hudson G, Mason D, Selby P, Linch DC. 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):1046-51.
- Horn H, Ziepert M, Becher C, Barth TF, Bernd HW, Feller AC, Klapper W, Hummel M, Stein H, Hansmann ML, Schmelter C, Möller P, Cogliatti S, Pfreundschuh M, Schmitz N, Trümper L, Siebert R, Loeffler M, Rosenwald A, Ott G; German High-Grade Non-Hodgkin Lymphoma Study Group. MYC status in concert with BCL2 and BCL6 expression predicts outcome in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2013; 121(12):2253-63.
- Huang JZ, Sanger WG, Greiner TC, Staudt LM, Weisenburger DD, Pickering DL, Lynch JC, Armitage JO, Warnke RA, Alizadeh AA, Lossos IS, Levy R, Chan WC. The t(14;18) defines a unique subset of diffuse large B-cell lymphoma with a germinal center B-cell gene expression profile. *Blood* 2002; 99(7):2285-90.
- Hummel M, Bentink S, Berger H, Klapper W, Wessendorf S, Barth TF, Bernd HW, Cogliatti SB, Dierlamm J, Feller AC, Hansmann ML, Haralambieva E, Harder L, Hasenclever D, Kühn M, Lenze D, Lichter P, Martin-Subero JI, Möller P, Müller-Hermelink HK, Ott G, Parwaresch RM, Pott C, Rosenwald A, Rosolowski M, Schwaenen C, Stürzenhofecker B, Szczepanowski M, Trautmann H, Wacker HH, Spang R, Loeffler M, Trümper L, Stein H, Siebert R; Molecular Mechanisms in Malignant Lymphomas Network Project of the Deutsche Krebshilfe. A biologic definition of Burkitt's lymphoma from transcriptional and genomic profiling. *New England Journal of Medicine* 2006; 354(23):2419-30.
- Iqbal J, Greiner TC, Patel K, Dave BJ, Smith L, Ji J, Wright G, Sanger WG, Pickering DL, Jain S, Horsman DE, Shen Y, Fu K, Weisenburger DD, Hans CP, Campo E, Gascoyne RD, Rosenwald A, Jaffe ES, Delabie J, Rimsza L, Ott G, Müller-Hermelink HK, Connors JM, Vose JM, McKeithan T, Staudt LM, Chan WC; Leukemia/Lymphoma Molecular Profiling Project. Distinctive patterns of BCL6 molecular alterations and their functional consequences in different subgroups of diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia* 2007; 21(11):2332-43.
- Iqbal J, Meyer PN, Smith LM, Johnson NA, Vose JM, Greiner TC, Connors JM, Staudt LM, Rimsza L, Jaffe E, Rosenwald A, Ott G, Delabie J, Campo E, Braziel RM, Cook JR, Tubbs RR, Gascoyne RD, Armitage JO, Weisenburger DD, Chan WC. BCL2 predicts survival in germinal center B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma treated with CHOP-like therapy and rituximab. *Clinical Cancer Research* 2011; 17(24):7785-95.
- Iqbal J, Neppalli VT, Wright G, Dave BJ, Horsman DE, Rosenwald A, Lynch J, Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, Gascoyne RD, Campo E, Ott G, Müller-Hermelink HK, Delabie J, Jaffe ES, Grogan TM, Connors JM, Vose JM, Armitage JO, Staudt LM, Chan

- WC. 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):961-8.
- Iqbal J, Sanger WG, Horsman DE, Rosenwald A, Pickering DL, Dave B, Dave S, Xiao L, Cao K, Zhu Q, Sherman S, Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, Gascoyne RD, Ott G, Müller-Hermelink HK, Delabie J, Braziel RM, Jaffe ES, Campo E, Lynch JC, Connors JM, Vose JM, Armitage JO, Grogan TM, Staudt LM, Chan WC. BCL2 translocation defines a unique tumor subset within the germinal center B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma. *American Journal of Pathology* 2004; 165(1):159-66.
- Ishii K, Yamamoto Y, Nomura S. CD30-negative diffuse large B-cell lymphoma expressing ALK. *Rinsho Ketsueki* 2005; 46(7):501-6.
- Isimbaldi G, Bandiera L, d'Amore ES, Conter V, Milani M, Mussolin L, Rosolen A. ALK-positive plasmablastic B-cell lymphoma with the clathrin-ALK gene rearrangement. *Pediatric blood and cancer* 2006; 46(3):390-1.
- Jaffe ES, Harris NL, Vardiman JW, Campo E, Arber DA. *Hematopathology*. First Edition Elsevier 2011.
- Jerkeman M, Aman P, Cavallin-Stahl E, Torlakovic E, Akerman M, Mitelman F, Fioretos T. Prognostic implications of BCL6 rearrangement in uniformly treated patients with diffuse large B-cell lymphoma--a Nordic Lymphoma Group study. *International Journal of Oncology* 2002; 20(1):161-5.
- Johnson NA, Savage KJ, Ludkovski O, Ben-Neriah S, Woods R, Steidl C, Dyer MJ, Siebert R, Kuruvilla J, Klasa R, Connors JM, Gascoyne RD, Horsman DE. Lymphomas with concurrent BCL2 and MYC translocations: the critical factors associated with survival. *Blood* 2009; 114(11):2273-9.
- Johnson NA, Slack GW, Savage KJ, Connors JM, Ben-Neriah S, Rogic S, Scott DW, Tan KL, Steidl C, Sehn LH, Chan WC, Iqbal J, Meyer PN, Lenz G, Wright G, Rimsza LM, Valentino C, Brunhoeber P, Grogan TM, Braziel RM, Cook JR, Tubbs RR, Weisenburger DD, Campo E, Rosenwald A, Ott G, Delabie J, Holcroft C, Jaffe ES, Staudt LM, Gascoyne RD. Concurrent expression of MYC and BCL2 in diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone. *Journal of Clinical Oncology* 2012; 30(28):3452-9.
- Joos S, Falk MH, Lichter P, Haluska FG, Henglein B, Lenoir GM, Bornkamm GW. Variable breakpoints in Burkitt lymphoma cells with chromosomal t(8;14) translocation separate c-myc and the IgH locus up to several hundred kb. *Human Molecular Genetics* 1992; 1(8):625-32.

- Joos S, Haluska FG, Falk MH, Henglein B, Hameister H, Croce CM, Bornkamm GW. Mapping chromosomal breakpoints of Burkitt's t(8;14) translocations far upstream of c-myc. *Cancer Research* 1992; 52(23):6547-52.
- Klapper W, Stoecklein H, Zeynalova S, Ott G, Kosari F, Rosenwald A, Loeffler M, Trümper L, Pfreundschuh M, Siebert R; German High-Grade Non-Hodgkin's Lymphoma Study Group. 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):2226-9.
- Klapproth K, Wirth T. Advances in the understanding of MYC-induced lymphomagenesis. *British Journal of Haematology* 2010; 149(4):484-97.
- Klein U, Dalla-Favera R. Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. *Nature Reviews Immunology* 2008; 8(1):22-33.
- Kluk MJ, Chapuy B, Sinha P, Roy A, Dal Cin P, Neuberg DS, Monti S, Pinkus GS, Shipp MA, Rodig SJ. Immunohistochemical detection of MYC-driven diffuse large B-cell lymphomas. *Plos One* 2012; 7(4):e33813.
- Kramer MH, Hermans J, Wijburg E, Philippo K, Geelen E, van Krieken JH, de Jong D, Maartense E, Schuurin E, Kluin PM. Clinical relevance of BCL2, BCL6, and MYC rearrangements in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 1998; 92(9):3152-62.
- Lam LT, Wright G, Davis RE, Lenz G, Farinha P, Dang L, Chan JW, Rosenwald A, Gascoyne RD, Staudt LM. Cooperative signaling through the signal transducer and activator of transcription 3 and nuclear factor- κ B pathways in subtypes of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2008; 111(7):3701-13.
- Laurent C, Do C, Gascoyne RD, Lamant L, Ysebaert L, Laurent G, Delsol G, Brousset P. Anaplastic lymphoma kinase-positive diffuse large B-cell lymphoma: a rare clinicopathologic entity with poor prognosis. *J Clin Oncol*. 2009 Sep 1;27(25):4211-6.
- Le Gouill S, Talmant P, Touzeau C, Moreau A, Garand R, Juge-Morineau N, Gaillard F, Gastinne T, Milpied N, Moreau P, Harousseau JL, 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):1335-42.

- Lennert K, Feller AC. Histopathology of non-Hodgkin's lymphomas. Springer Verlag: Berlin 1992.
- Lenz G, Wright G, Dave SS, Xiao W, Powell J, Zhao H, Xu W, Tan B, Goldschmidt N, Iqbal J, Vose J, Bast M, Fu K, Weisenburger DD, Greiner TC, Armitage JO, Kyle A, May L, Gascoyne RD, Connors JM, Troen G, Holte H, Kvaloy S, Dierickx D, Verhoef G, Delabie J, Smeland EB, Jares P, Martinez A, Lopez-Guillermo A, Montserrat E, Campo E, Braziel RM, Miller TP, Rimsza LM, Cook JR, Pohlman B, Sweetenham J, Tubbs RR, Fisher RI, Hartmann E, Rosenwald A, Ott G, Muller-Hermelink HK, Wrench D, Lister TA, Jaffe ES, Wilson WH, Chan WC, Staudt LM; Lymphoma/Leukemia Molecular Profiling Project. Stromal gene signatures in large-B-cell lymphomas. *N Engl J Med*. 2008 Nov 27;359(22):2313-23.
- Lenz G, Staudt LM. Aggressive Lymphomas. *New England Journal of Medicine* 2010; 362(15):1417-29.
- Leucci E, Cocco M, Onnis A, De Falco G, van Cleef P, Bellan C, van Rijk A, Nyagol J, Byakika B, Lazzi S, Tosi P, van Krieken H, Leoncini L. MYC translocation-negative classical Burkitt lymphoma cases: an alternative pathogenetic mechanism involving miRNA deregulation. *Journal of Pathology* 2008; 216(4):440-50.
- Lin Y, Wong K, Calame K. Repression of c-myc transcription by Blimp-1, an inducer of terminal B cell differentiation. *Science* 1997; 276(5312):596-9.
- Lohr JG, Stojanov P, Lawrence MS, Auclair D, Chapuy B, Sougnez C, Cruz-Gordillo P, Knoechel B, Asmann YW, Slager SL, Novak AJ, Dogan A, Ansell SM, Link BK, Zou L, Gould J, Saksena G, Stransky N, Rangel-Escareño C, Fernandez-Lopez JC, Hidalgo-Miranda A, Melendez-Zajgla J, Hernández-Lemus E, Schwarz-Cruz y Celis A, Imaz-Rosshandler I, Ojesina AI, Jung J, Pedamallu CS, Lander ES, Habermann TM, Cerhan JR, Shipp MA, Getz G, Golub TR. Discovery and prioritization of somatic mutations in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) by whole-exome sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(10):3879-84.
- Manolov G, Manolova Y, Klein G, Lenoir G, Levan A. Alternative involvement of two cytogenetically distinguishable breakpoints on chromosome 8 in Burkitt's lymphoma associated translocations. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 1986; 20(1-2):95-9.
- Martinez D, Valera A, Perez NS, Sua Villegas LF, Gonzalez-Farre B, Sole C, Gine E, Lopez-Guillermo A, Roue G, Martinez S, Sant F, Warzocha K, Robak T, Czader M, Villamor N, Colomo L, Campo E, Martinez A. Plasmablastic transformation of low-grade B-cell

- lymphomas: report on 6 cases. *American Journal of Surgical Pathology* 2013 Feb;37(2):272-81.
- McManus DT, Catherwood MA, Carey PD, Cuthbert RJ, Alexander HD. ALK-positive diffuse large B-cell lymphoma of the stomach associated with a clathrin-ALK rearrangement. *Human Pathology* 2004; 35(10):1285-8.
- Meyer N, Penn LZ. Reflecting on 25 years with MYC. *Nature Reviews Cancer* 2008; 8(12):976-90.
- Migliazza A, Martinotti S, Chen W, Fusco C, Ye BH, Knowles DM, Offit K, Chaganti RS, Dalla-Favera R. Frequent somatic hypermutation of the 5' noncoding region of the BCL6 gene in B-cell lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1995; 92(26):12520-4.
- Miller TP, Grogan TM, Dahlberg S, Spier CM, Brazier RM, Banks PM, Foucar K, Kjeldsberg CR, Levy N, Nathwani BN. Prognostic significance of the Ki-67-associated proliferative antigen in aggressive non-Hodgkin's lymphomas: a prospective Southwest Oncology Group trial. *Blood* 1994; 83(6):1460-66.
- Molyneux EM, Rochford R, Griffin B, Newton R, Jackson G, Menon G, Harrison CJ, Israels T, Bailey S. Burkitt's lymphoma. *Lancet* 2012; 379(9822):1234-44.
- Momose S, Tamaru J, Kishi H, Mikata I, Mori M, Toyozumi Y, Itoyama S. Hyperactivated STAT3 in ALK-positive diffuse large B-cell lymphoma with clathrin-ALK fusion. *Human Pathology* 2009; 40(1):75-82.
- Montes-Moreno S, Gonzalez-Medina AR, Rodriguez-Pinilla SM, Maestre L, Sanchez-Verde L, Roncador G, Mollejo M, García JF, Menarguez J, Montalbán C, Ruiz-Marcellan MC, Conde E, Piris MA. Aggressive large B-cell lymphoma with plasma cell differentiation: immunohistochemical characterization of plasmablastic lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma with partial plasmablastic phenotype. *Haematologica* 2010; 95(8):1342-9.
- Mossafa H, Damotte D, Jenabian A, Delarue R, Vincenneau A, Amouroux I, Jeandel R, Khoury E, Martelli JM, Samson T, Tapia S, Flandrin G, Troussard X. Non-Hodgkin's lymphomas with Burkitt-like cells are associated with c-Myc amplification and poor prognosis. *Leukemia and Lymphoma* 2006; 47(9):1885-93.
- Naud JF, Eilers M. PIM1 and MYC: a changing relationship? *Nature Cell Biology* 2007; 9(8):873-5.

- Niitsu N, Okamoto M, Miura I, Hirano M. Clinical features and prognosis of de novo diffuse large B-cell lymphoma with t(14;18) and 8q24/c-MYC translocations. *Leukemia* 2009; 23(4):777-83.
- Niitsu N, Okamoto M, Nakamura N, Nakamine H, Aoki S, Hirano M, Miura I. Prognostic impact of chromosomal alteration of 3q27 on nodal B-cell lymphoma: correlation with histology, immunophenotype, karyotype, and clinical outcome in 329 consecutive patients. *Leukemia Research* 2007; 31(9):1191-7.
- Niklinski J, Claassen G, Meyers C, Gregory MA, Allegra CJ, Kaye FJ, Hann SR, Zajac-Kaye M. Disruption of Myc-tubulin interaction by hyperphosphorylation of c-Myc during mitosis or by constitutive hyperphosphorylation of mutant c-Myc in Burkitt's lymphoma. *Molecular and Cellular Biology* 2000; 20(14):5276-84.
- Obermann EC, Csato M, Dirnhofer S, Tzankov A. Aberrations of the MYC gene in unselected cases of diffuse large B-cell lymphoma are rare and unpredictable by morphological or immunohistochemical assessment. *Journal of Clinical Pathology* 2009; 62(8):754-6.
- Offit K, Lo Coco F, Louie DC, Parsa NZ, Leung D, Portlock C, Ye BH, Lista F, Filippa DA, Rosenbaum A, et al. Rearrangement of the bcl-6 gene as a prognostic marker in diffuse large-cell lymphoma. *New England Journal of Medicine* 1994; 331(2):74-80.
- Ohno H, Fukuhara S. Significance of rearrangement of the BCL6 gene in B-cell lymphoid neoplasms. *Leukemia and Lymphoma* 1997; 27(1-2):53-63.
- Onciu M, Behm FG, Downing JR, Shurtleff SA, Raimondi SC, Ma Z, Morris SW, Kennedy W, Jones SC, Sandlund JT. ALK-positive plasmablastic B-cell lymphoma with expression of the NPM-ALK fusion transcript: report of 2 cases. *Blood* 2003; 102(7):2642-4.
- Onnis A, De Falco G, Antonicelli G, Onorati M, Bellan C, Sherman O, Sayed S, Leoncini L. Alteration of microRNAs regulated by c-Myc in Burkitt lymphoma. *Plos One* 2010; 5(9).
- Ott G, Ziepert M, Klapper W, Horn H, Szczepanowski M, Bernd HW, Thorns C, Feller AC, Lenze D, Hummel M, Stein H, Müller-Hermelink HK, Frank M, Hansmann ML, Barth TF, Möller P, Cogliatti S, Pfreundschuh M, Schmitz N, Trümper L, Loeffler M, Rosenwald A. Immunoblastic morphology but not the immunohistochemical GCB/nonGCB classifier predicts outcome in diffuse large B-cell lymphoma in the RICOVER-60 trial of the DSHNHL. *Blood*. 2010 Dec 2;116(23):4916-25.

- Pasqualucci L, Trifonov V, Fabbri G, Ma J, Rossi D, Chiarenza A, Wells VA, Grunn A, Messina M, Elliot O, Chan J, Bhagat G, Chadburn A, Gaidano G, Mullighan CG, Rabadan R, Dalla-Favera R. Analysis of the coding genome of diffuse large B-cell lymphoma. *Nat Genet.* 2011 Jul 31;43(9):830-7.
- Piris M, Brown DC, Gatter KC, Mason DY. CD30 expression in non-Hodgkin's lymphoma. *Histopathology* 1990; 17(3):211-18.
- Raetz EA, Perkins SL, Carlson MA, Schooler KP, Carroll WL, Virshup DM. The nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase fusion protein induces c-Myc expression in pediatric anaplastic large cell lymphomas. *American Journal of Pathology* 2002; 161(3):875-83.
- Ramiro AR, Jankovic M, Eisenreich T, Difilippantonio S, Chen-Kiang S, Muramatsu M, Honjo T, Nussenzweig A, Nussenzweig MC. AID is required for c-myc/IgH chromosome translocations in vivo. *Cell* 2004; 118(4):431-8.
- Raphael M, Gentilhomme O, Tulliez M, Byron PA, Diebold J. Histopathologic features of high-grade non-Hodgkin's lymphomas in acquired immunodeficiency syndrome. The French Study Group of Pathology for Human Immunodeficiency Virus-Associated Tumors. *Archives of Laboratory and Pathology Medicine* 1991; 115(1):15-20.
- Rätsch A, Joos S, Kioschis P, Lichter P. Topological organization of the MYC/IGK locus in Burkitt's lymphoma cells assessed by nuclear halo preparations. *Experimental Cell Research* 2002; 273(1):12-20.
- Reichard KK, McKenna RW, Kroft SH. ALK-positive diffuse large B-cell lymphoma: report of four cases and review of the literature. *Modern Pathology* 2007; 20(3):310-9.
- Reimold AM, Iwakoshi NN, Manis J, Vallabhajosyula P, Szomolanyi-Tsuda E, Gravalles EM, Friend D, Grusby MJ, Alt F, Glimcher LH. Plasma cell differentiation requires the transcription factor XBP-1. *Nature* 2001; 412(6844):300-7.
- Robledo C, García JL, Caballero D, Conde E, Arranz R, Flores T, Grande C, Rodríguez J, García E, Sáez AI, González M, Gutiérrez NC, Piris MA, Hernández JM; Spanish Lymphoma/ Autologous Bone Marrow Transplant Study Group (GEL-TAMO). Array comparative genomic hybridization identifies genetic regions associated with outcome in aggressive diffuse large B-cell lymphomas. *Cancer* 2009; 115(16):3728-37.
- Rosenwald A, Wright G, Chan WC, Connors JM, Campo E, Fisher RI, Gascoyne RD, Muller-Hermelink HK, Smeland EB, Giltnane JM, Hurt EM, Zhao H, Averett L, Yang L, Wilson

- WH, Jaffe ES, Simon R, Klausner RD, Powell J, Duffey PL, Longo DL, Greiner TC, Weisenburger DD, Sanger WG, Dave BJ, Lynch JC, Vose J, Armitage JO, Montserrat E, López-Guillermo A, Grogan TM, Miller TP, LeBlanc M, Ott G, Kvaloy S, Delabie J, Holte H, Krajci P, Stokke T, Staudt LM; Lymphoma/Leukemia Molecular Profiling Project. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *New England Journal of Medicine* 2002; 346(25):1937-47.
- Ruddell A, Mezquita P, Brandvold KA, Farr A, Iritani BM. B lymphocyte-specific c-Myc expression stimulates early and functional expansion of the vasculature and lymphatics during lymphomagenesis. *American Journal of Pathology* 2003; 163(6):2233-45.
- Rudzki Z, Rucińska M, Jurczak W, Skotnicki AB, Maramorosz-Kurianowicz M, Mruk A, Piróg K, Utych G, Bodzioch P, Srebro-Stariczuk M, Włodarska I, Stachura J. ALK-positive diffuse large B-cell lymphoma: two more cases and a brief literature review. *Polish Journal of Pathology* 2005; 56(1):37-45.
- Ruzinova MB, Caron T, Rodig SJ. Altered subcellular localization of c-Myc protein identifies aggressive B-cell lymphomas harboring a c-MYC translocation. *American Journal of Surgical Pathology* 2010; 34(6):882-91.
- Salaverria I, Siebert R. The gray zone between Burkitt's lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma from a genetics perspective. *Journal of Clinical Oncology* 2011; 29(14):1835-43.
- Salaverria I, Zettl A, Beà S, Hartmann EM, Dave SS, Wright GW, Boerma EJ, Kluijn PM, Ott G, Chan WC, Weisenburger DD, Lopez-Guillermo A, Gascoyne RD, Delabie J, Rimsza LM, Braziel RM, Jaffe ES, Staudt LM, Müller-Hermelink HK, Campo E, Rosenwald A; Leukemia and Lymphoma Molecular Profiling Project (LLMPP). Chromosomal alterations detected by comparative genomic hybridization in subgroups of gene expression-defined Burkitt's lymphoma. *Haematologica* 2008; 93(9):1327-34.
- Sander S, Calado DP, Srinivasan L, Köchert K, Zhang B, Rosolowski M, Rodig SJ, Holzmann K, Stilgenbauer S, Siebert R, Bullinger L, Rajewsky K. Synergy between PI3K signaling and MYC in Burkitt lymphomagenesis. *Cancer Cell* 2012; 22(2):167-79.
- Sarosiek KA, Malumbres R, Nechushtan H, Gentles AJ, Avisar E, Lossos IS. Novel IL-21 signaling pathway up-regulates c-Myc and induces apoptosis of diffuse large B-cell lymphomas. *Blood* 2010; 115(3):570-80.
- Savage KJ, Johnson NA, Ben-Neriah S, Connors JM, Sehn LH, Farinha P, Horsman DE, Gascoyne RD. MYC gene rearrangements are associated with a poor prognosis in

- diffuse large B-cell lymphoma patients treated with R-CHOP chemotherapy. *Blood* 2009; 114(17):3533-7
- Schmitz R, Young RM, Ceribelli M, Jhavar S, Xiao W, Zhang M, Wright G, Shaffer AL, Hodson DJ, Buras E, Liu X, Powell J, Yang Y, Xu W, Zhao H, Kohlhammer H, Rosenwald A, Kluijn P, Müller-Hermelink HK, Ott G, Gascoyne RD, Connors JM, Rimsza LM, Campo E, Jaffe ES, Delabie J, Smeland EB, Olgwang MD, Reynolds SJ, Fisher RI, Braziel RM, Tubbs RR, Cook JR, Weisenburger DD, Chan WC, Pittaluga S, Wilson W, Waldmann TA, Rowe M, Mbulaiteye SM, Rickinson AB, Staudt LM. Burkitt lymphoma pathogenesis and therapeutic targets from structural and functional genomics. *Nature* 2012; 490(7418):116-20.
- Schrader A, Bentink S, Spang R, Lenze D, Hummel M, Kuo M, Arrand JR, Murray PG, Trümper L, Kube D, Vockerodt M. High Myc activity is an independent negative prognostic factor for diffuse large B cell lymphomas. *International Journal of Cancer* 2012; 131(4):E348-61.
- Scuto A, Kujawski M, Kowolik C, Krymskaya L, Wang L, Weiss LM, Digiusto D, Yu H, Forman S, Jove R. STAT3 inhibition is a therapeutic strategy for ABC-like diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer Research* 2011; 71(9):3182-8.
- Seegmiller AC, Garcia R, Huang R, Maleki A, Karandikar NJ, Chen W. Simple karyotype and bcl-6 expression predict a diagnosis of Burkitt lymphoma and better survival in IG-MYC rearranged high-grade B-cell lymphomas. *Modern Pathology* 2010; 23(7):909-20.
- Sehn LH, Berry B, Chhanabhai M, Fitzgerald C, Gill K, Hoskins P, Klasa R, Savage KJ, Shenkier T, Sutherland J, Gascoyne RD, Connors JM. The revised International Prognostic Index (R-IPI) is a better predictor of outcome than the standard IPI for patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *Blood* 2007; 109(5):1857-61.
- Sehn LH, Donaldson J, Chhanabhai M, Fitzgerald C, Gill K, Klasa R, MacPherson N, O'Reilly S, Spinelli JJ, Sutherland J, Wilson KS, Gascoyne RD, Connors JM. Introduction of combined CHOP plus rituximab therapy dramatically improved outcome of diffuse large B-cell lymphoma in British Columbia. *Journal of Clinical Oncology* 2005; 23(22):5027-33.
- Sense llistat d'autors. A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project. *New England Journal of Medicine* 1993; 329(14):987-94.

- Shaffer AL 3rd, Staudt LM The case of the missing c-Myc. *Nature Immunology* 2012; 13(11):1029-31.
- Shi M, Miron PM, Hutchinson L, Woda BA, Nath R, Cerny J, Yu H. Anaplastic lymphoma kinase-positive large B-cell lymphoma with complex karyotype and novel ALK gene rearrangements. *Human Pathology* 2011; 42(10):1562-7.
- Siebert R, Matthiesen P, Harder S, Zhang Y, Borowski A, Zühlke-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):984-90
- Slack GW, Gascoyne RD. MYC and aggressive B-cell lymphomas. *Advances in anatomic pathology* 2011; 18(3):219-28.
- Snuderl M, Kolman OK, Chen YB, Hsu JJ, Ackerman AM, Dal Cin P, Ferry JA, Harris NL, Hasserjian RP, Zukerberg LR, Abramson JS, Hochberg EP, Lee H, Lee AI, Toomey CE, Sohani AR. B-cell lymphomas with concurrent IGH-BCL2 and MYC rearrangements are aggressive neoplasms with clinical and pathologic features distinct from Burkitt lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma. *American Journal of Surgical Pathology* 2010; 34(3):327-40.
- Stachurski D, Miron PM, Al-Homsi S, Hutchinson L, Harris NL, Woda B, Wang SA. Anaplastic lymphoma kinase-positive diffuse large B-cell lymphoma with a complex karyotype and cryptic 3' ALK gene insertion to chromosome 4 q22-24. *Human Pathology* 2007; 38(6):940-5.
- Stasik CJ, Nitta H, Zhang W, Mosher CH, Cook JR, Tubbs RR, Unger JM, Brooks TA, Persky DO, Wilkinson ST, Grogan TM, Rimsza LM. Increased MYC gene copy number correlates with increased mRNA levels in diffuse large B-cell lymphoma. *Haematologica* 2010; 95(4):597-603.
- Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW. WHO classification of tumors of haematopoietic and lymphoid tissues. IARC: Lyon 2008.
- Taddesse-Heath L, Meloni-Ehrig A, Scheerle J, Kelly JC, Jaffe ES. Plasmablastic lymphoma with MYC translocation: evidence for a common pathway in the generation of plasmablastic features. *Modern Pathology* 2010; 23(7):991-9.
- Tagawa H, Suguro M, Tsuzuki S, Matsuo K, Karnan S, Ohshima K, Okamoto M, Morishima Y, Nakamura S, Seto M. Comparison of genome profiles for identification of distinct subgroups of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2005; 106(5):1770-77.

- Tapia G, Lopez R, Muñoz-Mármol AM, Mate JL, Sanz C, Marginet R, Navarro JT, Ribera JM, Ariza A. Immunohistochemical detection of MYC protein correlates with MYC gene status in aggressive B cell lymphomas. *Histopathology* 2011; 59(4):672-8.
- Testoni M, Kwee I, Greiner TC, Montes-Moreno S, Vose J, Chan WC, Chiappella A, Baldini L, Ferreri AJ, Gaidano G, Mian M, Zucca E, Bertoni F. Gains of MYC locus and outcome in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *British Journal of Haematology* 2011; 155(2):274-7.
- Tibiletti MG, Martin V, Bernasconi B, Del Curto B, Pecciarini L, Uccella S, Pruneri G, Ponzoni M, Mazzucchelli L, Martinelli G, Ferreri AJ, 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. *Human Pathology* 2009; 40(5):645-52.
- Tirado CA, Chen W, García R, Kohlman KA, Rao N. Genomic profiling using array comparative genomic hybridization define distinct subtypes of diffuse large B-cell lymphoma: a review of the literature. *Journal of Hematology and Oncology* 2012; 5:54.
- Thorley-Lawson DA, Allday MJ. The curious case of the tumour virus: 50 years of Burkitt's lymphoma. *Nature Reviews Microbiology* 2008; 6(12):913-24.
- Tomita N, Tokunaka M, Nakamura N, Takeuchi K, Koike J, Motomura S, Miyamoto K, Kikuchi A, Hyo R, Yakushijin Y, Masaki Y, Fujii S, Hayashi T, Ishigatsubo Y, Miura I. Clinicopathological features of lymphoma/leukemia patients carrying both BCL2 and MYC translocations. *Haematologica* 2009; 94(7):935-43.
- Toujani S, Dessen P, Ithzar N, Danglot G, Richon C, Vassetzky Y, Robert T, Lazar V, Bosq J, Da Costa L, Pérot C, Ribrag V, Patte C, Wiels J, Bernheim A. High resolution genome-wide analysis of chromosomal alterations in Burkitt's lymphoma. *Plos One* 2009; 4(9):e7089.
- Tsujimoto Y, Cossman J, Jaffe E, Croce CM. Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* 1985; 228(4706):1440-43.
- Vallespinós M, Fernández D, Rodríguez L, Alvaro-Blanco J, Baena E, Ortiz M, Dukovska D, Martínez D, Rojas A, Campanero MR, Moreno de Alborán I. B Lymphocyte commitment program is driven by the proto-oncogene c-Myc. *Journal of Immunology* 2011; 186(12):6726-36.

- Van Imhoff GW, Boerma EJ, van der Holt B, Schuurung E, Verdonck LF, Kluin-Nelemans HC, Kluin PM. Prognostic impact of germinal center-associated proteins and chromosomal breakpoints in poor-risk diffuse large B-cell lymphoma. *Journal of Clinical Oncology* 2006; 24(25):4135-42.
- Van Lohuizen M, Verbeek S, Scheijen B, Wientjens E, van der Gulden H, Berns A. Identification of cooperating oncogenes in E mu-myc transgenic mice by provirus tagging. *Cell* 1991; 65(5):737-52.
- Van Roosbroeck K, Cools J, Dierickx D, Thomas J, Vandenberghe P, Stul M, Delabie J, De Wolf-Peeters C, Marynen P, Wlodarska I. ALK-positive large B-cell lymphomas with cryptic SEC31A-ALK and NPM1-ALK fusions. *Haematologica* 2010; 95(3):509-13.
- Ventura RA, Martin-Subero JI, Jones M, McParland J, Gesk S, Mason DY, Siebert R. FISH analysis for the detection of lymphoma-associated chromosomal abnormalities in routine paraffin-embedded tissue. *Journal of Molecular Diagnostics* 2006; 8(2):141-51.
- Victora GD, Dominguez-Sola D, Holmes AB, Deroubaix S, Dalla-Favera R, Nussenzweig MC. Identification of human germinal center light and dark zone cells and their relationship to human B-cell lymphomas. *Blood* 2012; 120(11):2240-8.
- Weiss LM, Warnke RA, Sklar J, Cleary ML. Molecular analysis of the t(14;18) chromosomal translocation in malignant lymphomas. *New England Journal of Medicine* 1987;317(19):1185-89.
- Xu-Monette ZY, Wu L, Visco C, Tai YC, Tzankov A, Liu WM, Montes-Moreno S, Dybkaer K, Chiu A, Orazi A, Zu Y, Bhagat G, Richards KL, Hsi ED, Zhao XF, Choi WW, Zhao X, van Krieken JH, Huang Q, Huh J, Ai W, Ponzoni M, Ferreri AJ, Zhou F, Kahl BS, Winter JN, Xu W, Li J, Go RS, Li Y, Piris MA, Møller MB, Miranda RN, Abruzzo LV, Medeiros LJ, Young KH. Mutational profile and prognostic significance of TP53 in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with R-CHOP: report from an International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program Study. *Blood* 2012;120(19): 3986-96.
- Yoon SO, Jeon YK, Paik JH, Kim WY, Kim YA, Kim JE, Kim CW. 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):205-17.

- Yotsumoto M, Ichikawa N, Ueno M, Higuchi Y, Asano N, Kobayashi H. CD20-negative CD138-positive leukemic large cell lymphoma with plasmablastic differentiation with an IgH/MYC translocation in an HIV-positive patient. *Internal Medicine* 2009; 48(7):559-62.
- Zamo A, Chiarle R, Piva R, Howes J, Fan Y, Chilosi M, Levy DE, Inghirami G. Anaplastic lymphoma kinase (ALK) activates Stat3 and protects hematopoietic cells from cell death. *Oncogene* 2002; 21(7):1038-47.
- Zeidler R, Joos S, Delecluse HJ, Klobeck G, Vuillaume M, Lenoir GM, Bornkamm GW, Lipp M. Breakpoints of Burkitt's lymphoma t(8;22) translocations map within a distance of 300 kb downstream of MYC. *Genes, Chromosomes and Cancer* 1994; 9(4):282-7.
- Zhang A, Ohshima K, Sato K, Kanda M, Suzumiya J, Shimazaki K, Kawasaki C, Kikuchi M. Prognostic clinicopathologic factors, including immunologic expression in diffuse large B-cell lymphomas. *Pathol Int.* 1999 Dec;49(12):1043-52.
- Zhang D, Denley RC, Filippa DA, Teruya-Feldstein J. ALK-positive diffuse large B-cell lymphoma with the t(2;17)(p23;q23). *Applied Immunohistochemistry and molecular morphology* 2009; 17(2):172-7.
- Zhang J, Grubor V, Love CL, Banerjee A, Richards KL, Mieczkowski PA, Dunphy C, Choi W, Au WY, Srivastava G, Lugar PL, Rizzieri DA, Lagoo AS, Bernal-Mizrachi L, Mann KP, Flowers C, Naresh K, Evens A, Gordon LI, Czader M, Gill JI, Hsi ED, Liu Q, Fan A, Walsh K, Jima D, Smith LL, Johnson AJ, Byrd JC, Luftig MA, Ni T, Zhu J, Chadburn A, Levy S, Dunson D, Dave SS. Genetic heterogeneity of diffuse large B-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 Jan 22;110(4):1398-403.