

Universitat Autònoma de Barcelona
Facultat de Biociències
Departament de Biologia Animal, de Biologia Vegetal i d'Ecologia



Universitat Autònoma de Barcelona

Caracterització genètica del limfoma esplènic de la zona marginal (LEZM)

Memòria presentada per
MARTA SALIDO GALEOTE
per optar al grau de Doctor de la Universitat Autònoma de Barcelona

Aquesta tesi ha estat realitzada sota la tutoria de la Dra. M^aRosa Caballin
Fernández del departament de Biologia Animal, de Biologia Vegetal i d'Ecologia
de la Universitat Autònoma de Barcelona
i la direcció del Dr. Francesc Solé i Ristol al Departament d'Anatomia
Patològica de l'Hospital del Mar

Tesi adscrita al Departament de Biologia Animal, de Biologia Vegetal i
d'Ecologia de la Universitat Autònoma de Barcelona

Vist i plau del director de tesi:

Dr. Francesc Solé Ristol



Universitat Autònoma de Barcelona

El Dr. FRANCESC SOLÉ RISTOL, doctor en Biologia i director científic de l'Institut Josep Carreras, campus ICO-GTIP de Badalona,

CERTIFIQUEN:

Que la Tesi Doctoral titulada CARACTERITZACIÓ DEL LIMFOMA ESPLÈNIC DE LA ZONA MARGINAL (LEZM), presentada per MARTA SALIDO GALEOTE, per tal d'accedir al títol de Doctora en Biologia, ha estat realitzada sota la seva direcció, estimant que reuneix els requisits formals i científics adients per la seva preceptiva lectura i defensa públiques.

I per a que així consti, i als efectes oportuns, signem la present certificació a Barcelona, a dia 4 de juliol de 2013.

Dr. Francesc Solé Ristol

Marta Salido Galeote

Als meus pares i

Germà

“Felicidad no es hacer lo que uno quiere sino querer lo que uno hace”

-Jean Paul Sartre-

AGRAÏMENTS

Por fin! Y con un: **GRACIAS A TODOS!** Seguramente acertaría más, porque después de tantos años... Y si he llegado hasta aquí es gracias a todos vosotros, los que estáis hojeando esta tesis buscando vuestro nombre☺. Este apartado se ha convertido en el HOLA de la ciencia, así que espero no decepcionaros. Y me repito, si me olvido de alguien, como bien dice *E. Punset*, es en favor de mi capacidad cognitiva... que el saber ocupa lugar!!

Gracias Kiko, por ser mi maestro y creer en mí, por contagiarme el entusiasmo por los cromosomas, por las risas en la kikerera, por los buenos momentos y los no tan buenos, por aguantar mi carácter...divertido! y por tu confianza en mí. GRACIAS!

A Lourdes por brindarme la oportunidad de trabajar en el laboratorio de citología hematológica, por presentarme a los linfocitos peludos...y por tu cariño. Y por supuesto, a la DOCTORA, porque me despierta las neuronas!

A Sergi Serrano por su confianza desde los inicios en el hospital del Mar y por su cariño incondicional (pese a que soy irremediabilmente tardona).

A Blanca, por todos estos años compartidos y los que nos quedan!, por ayudarme y valorarme y sobre todo por animarme a presentar esta tesis pese a mi desánimo.

A Eli, Rosa y Rosa Mari, por acogerme en el labo de la Esperanza. A Rosa Mari por ser nuestra enciclopedia andante, por su generosidad, y por compartir la adicción al chocolate!. A Rosa, por dejarme ser su sombra en el labo, por enseñarme la técnica de citogenética, que tiempos!!, por su buen humor y lo bien que lo pasamos con Manel y los Torrents!

A Encarna, porque de mayor quiero ser como ella, porque con ella descubrí el té con leche como sustituto del horrible café del Mar, chica lista (gallega) y por lo bien que me lo he pasado en los años viejos cuando preguntaba al gerente *“Enséñame la patita por debajo de la puerta...”*, un clásico!

A mis compañeras becarias de los inicios, en especial a Lurdes por compartir junto con Blanca esos momentos de *M3-estrés* frente al micro. A Natalia Rodón, por los momentos en el labo hasta las mil intentando montar la CGH! Y a Mari, que me enseñó a ser un poquito más ordenada en la poyata...Por nuestros desayunos, todas juntas, por esperarme☺, por tus consejos, tu amistad y por las de cenas y paellas con Mónica, Itziar y Rosa.

Ahhh y a Itzi por los chubasqueros!

A Carlota, Cristina y Olaya, mis compañeras becarias pequeñas! (esto pasa por no leer la tesis cuando toca). Por los buenos tiempos! A Carlota, por nuestras discusiones...de ciencia o no y por los buenos momentos en la kikerera y fuera de ella. A Cristina por acompañarme en mis inicios en los tumores sólidos con la mama y el HER2, por nuestras aventuras en los congresos y sobre todo por entenderme mejor

que nadie y seguir aguantándome. A Olaya, por no dejarme perder la ilusión, porque juntas aprendimos un montón, porque trabajar contigo no es trabajar, por mil cosas... y porque eres la mejor! Después de vosotras, nada fue lo mismo...

A Raquel, que siempre me apoyas y me entiendes porque fuiste tan "chula" como yo!, por ser una gran amiga y porque nos queda pendiente Nueva York! (Camila)

A la Carme por tu cariño, por los Jueves en "*El Vent*" y los buenos momentos que hemos pasado y los que nos quedan.

A María por nuestros momentos locos y divertidos en el labo, porque contigo el DAPI es azul y el mundo es rosa ☺, porque eres estupenda!! y te quiero un montón!

A Ana Ferrer por ayudarme a escribir este *BLOOD* de esplénicos, por tus ideas y revisiones exhaustivas, pero sobre todo por tus carcajadas, que nos amenizan las mañanas y porque como a ti, a mí también me encanta "*V de vendetta*"; a Leo por acompañarme en el capítulo: "*¿y mi tesis para cuándo?*" ☺ y a Silvia por su cariño.

A Bea Bellosillo por tu ayuda, tus consejos y por confiar en mí.

A Laura, Eulàlia, Crisis, Laia, Silvia, Mar, Alma, Ana y Rocío, todas las becarias que fueron leyendo la tesis por delante! Ufff ahora que os pongo en fila...cuantas!!! Gracias Crisis por ayudarme con la base de datos esplénica, por compartir patología y horarios☺. Anita gracias por tu ayuda incondicional en el labo, por tu generosidad, por tu paciencia. Eres de esas personas que te llevarías a casa y encima Escorpio!....pero sobre todo gracias por empujarme a escribir esta tesis. A la Roci, por nuestras charlas... "*I miss you*", y por tener siempre un ratín para ayudar a todos en el labo...eso sí, aventuras las justas!. A Silvia, por tu ayuda con los *ALKs*, porque es una gozada trabajar contigo...te echaré de menos. A Alma, por tus...Orcas, Orcas y más Orcas ☺!

A Luz por ayudarme en el análisis molecular de *EZH2* y por estar siempre dispuesta a explicarme cualquier duda molecular ... por pequeña que sea ☺.

Al grupo esplénico, Kiko, Lourdes, Antonio, Ana, Crisis, Vera y Calull, por los momentos en Palermo, Atenas, Toledo, Stressa...y por los que nos quedan!

A Anna P por ser una gran compañera de despacho...y por tener siempre galletitas cuando las necesito ☺

A l'Emili per animar-me a escriure aquesta tesi i fer-li una ullada al català, per portar la música a la kikerera i per amenitzar les tardes al micro!

A todos los patólogos y residentes del servicio de patología y a los compañeros de hematología clínica por animarme a presentar esta tesis.

...A todos los que habéis rotado por la kikerera y sois aire fresco en mi día a día.

Gracias a los subterráne@s por los momentos de vóley en la playa, de *tiki tiki*, por el buen rollo y por las cervecitas de después! AUPA SUBTERRANEOS!

Gracies als meus amics biòlegs, a l'Òscar, la Sandra, la Sílvia, al Ramirez, a l'Ignasi, a l'Ernesto, a la Bosc i a tota la colla que m'han animat a acabar aquesta tesi, per fi! En especial a la Sandra, per tirar la moneda que em va portar al grup d'en Kiko ☺, per acompanyar-me en tot aquest camí i fer-lo possible, i a la Silvia per estar sempre a punt!

A la Martita, porque es parte de mi familia.

A mis padres que me han enseñado a ser libre y por confiar en que podía llegar hasta aquí. En especial a mi padre, por enseñarme a ser sincera y a mi madre porque es la mejor persona que conozco. A mi hermano Carlos que es el más listo de todos y el más guapo! Os quiero.

A mi abuela Carmen, la más marchosa! A los Galeote, a mis primos y a mis tíos por estar siempre presentes y quererme tanto. A los Salido, por ser tantos ☺ y tan divertidos! Por su cariño y por darme ese gen artista.

MUCHAS GRACIAS!

Els treballs presentats en aquesta tesi han estat finançats gràcies a les següents ajudes:

1. Red temàtica de investigació Cooperativa en càncer RD06/0020/FEDER
2. Red temàtica de investigació Cooperativa en càncer RD07/0020/2004
3. Instituto Carlos III/FEDER RD09/0076/00036
4. Ministerio de Sanidad y consumo (Spain) PI07/0586
5. Xarxa de Bancs de tumors sponsored by Pla Director d'On de Catalunya (XBTC)

RESUM

El LZME és un tipus de limfoma B poc freqüent (<2% de tots els limfomes no-Hodgkin). Aproximadament un 70-80% dels pacients amb un LZME presenten alteracions citogenètiques i/o moleculars, però sense que s'hagi descrit una específica d'aquesta patologia. En el primer treball (Salido i cols., 2010) es descriu el perfil d'alteracions citogenètiques a una sèrie ampla de pacients diagnosticats d'un LZME (n=330), mitjançant les tècniques de citogenètica convencional (CC) i FISH. Aquest estudi identifica subgrups citogenètics amb rellevància pronòstica, destacant la necessitat de realitzar estudis citogenètics tan pel diagnòstic com per la correcta estratificació pronòstica d'aquests pacients. A més, en aquest estudi es confirma la elevada heterogeneïtat clínica i biològica del LZME.

El gen *EZH2* (7q36.1) es trova localitzat a una de les regions més freqüentment alterades al LZME. En el segon treball (Salido i cols., 2011) s'analitza l'estat mutacional d'aquest gen per la seva implicació a altres limfomes de cèl·lules B. Els resultats suggereixen que les mutacions a aquest gen no juguen un paper important a la patogènia d'aquesta entitat.

ABSTRACT

Splenic Marginal B-cell Lymphoma (SMZL) is a rare low-grade B-cell lymphoma (<2% of all non-Hodgkin lymphomas). Approximately 70-80% of patients presented chromosomal aberrations, however, without a disease-specific cytogenetic/molecular alteration. The first paper (Salido et al., 2010) describes the cytogenetic profile of a large series of patients diagnosed with a LZME (n = 330) using conventional cytogenetic techniques (CC) and FISH. This study identifies cytogenetic subgroups with prognostic significance, highlighting the need for cytogenetic studies for the correct prognostic stratification of these patients. In addition, this study confirms the biological and clinical heterogeneity of LZME.

EZH2 gene (7q36.1) is located at 7q, a region frequently altered in LZME. This gene was frequently mutated in Diffuse Large B-cell Lymphomas and altered in other neoplasms. In the second paper (Salido et al., 2011) the mutational status of this gene was analysed by direct sequencing, although no mutations were observed suggesting that *EZH2* does not play an important role in the pathogenesis of this entity.

ÍNDEX

Llistat d'abreviatures	i
Llistat de taules	v
Llistat de figures	ix
1. INTRODUCCIÓ	1
1.1. Limfomagènesi	3
1.1.1. El Gangli limfàtic	4
1.1.2. La melsa	7
1.1.3. Ontogènia dels limfòcits B	8
1.2. Neoplàsies de cèl.lules B	15
1.2.1. Introducció	15
1.2.2. Classificació de les neoplàsies de cèl.lules B	15
1.2.3. Alteracions cromosòmiques a les neoplasies de cèl.lules B	17
1.3. Limfoma esplènic de la zona marginal (LEZM)	21
1.3.1. Introducció i epidemiologia	21
1.3.2. Característiques histològiques, morfològiques i immunofenotípiques	21
1.3.3. Estat mutacional dels gens de les immunoglobulines	25
1.3.4. Característiques citogenètiques i moleculars	25
1.3.5. Alteracions moleculars del gen <i>EZH2</i>	32
1.4. Tècniques citogenètiques i moleculars aplicades a l'estudi dels LEZM	35
1.4.1. Citogenètica Convencional (CC)	35
1.4.2. Hibridació in situ fluorescent (FISH)	37
1.4.3. Tècniques de multicolor-FISH	42
1.4.4. Tècnica de seqüenciació	44

2. HIPÒTESI I OBJECTIUS	47
3. RESULTATS	51
3.1. <u>Article 1</u> : Cytogenetic aberrations and their prognostic value in a series of 330 splenic marginal zone B-cell lymphomas: a multicenter study of the Splenic B-Cell Lymphoma Group. Blood. 2010;116(9):1479-88	53
3.2. <u>Article 2</u> : Absence of mutations of the Histone Methyltransferase gene EZH2 in Splenic B-Cell Marginal Zone Lymphoma. Leuk Res.2011;35(3):e23-4.	65
4. DISCUSSIÓ	69
5. CONCLUSIONS	85
6. BIBLIOGRAFIA	87
7. ANNEXOS	101
7.1. Annex 1. Material i mètodes	103
7.2. Annex 2. Taules suplementàries. article 1	123

ABREVIATURES

ADN	Àcid desoxiribonucleic
ALK	<i>Anaplastic lymphoma kinase</i>
ARN	Àcid ribonucleic
ATM	<i>Ataxia telangiectasia mutated</i>
BACs	<i>Bacterial Artificial Chromosome</i> . Cromosomes artificials de bacteries
BCL-1	<i>B-cell leukemia/lymphoma 1</i>
BCL-2	<i>B-cell leukemia/lymphoma 2</i>
BCL-6	<i>B-cel leukemia/lymphoma 6</i>
BCR	Receptor de cèl.lules B
CC	Citogenètica convencional
CCND1	Ciclina D1
CCND2	Ciclina D2
CCND3	Ciclina D3
CDK	Ciclins dependents de cicle
CDK6	<i>Cyclin dependent kinase 6</i>
CDKN2A	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A</i>
CDKN2B	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2B</i>
CY3	Cyanina 32
CY5	Cyanina 52
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> , Àcid etilendiaminotetraacètic
EBV	<i>Epstein-Barr virus</i>
FISH	<i>Fluorescence in situ hybridization</i> . Hibridació in situ fluorescent
FITC	<i>Streptavidin-fluorescein isothiocyanate</i>
HCV	Virus de la hepatitis C
HGC	Hibridació Genòmica Comparada
aHGC	Arrays de Hibridació Genòmica Comparada
IG	Immunoglobulines
IGH	Cadena pesada del gen de les immunoglobulines
<i>IGHV</i>	Regió variable de les cadenes pesades de les immunoglobulines
IGK	Cadena lleugera Kappa del gen de les immunoglobulines
IGL	Cadena lleugera Lambda del gen de les immunoglobulines
ILSG	<i>International Lymphoma Study Group</i> , Grup internacional de limfomes
ISCN	<i>International System for Human Cytogenetics Nomenclature</i>
LB	Limfoma de Burkitt
LBDCG	limfoma B difús de cèl.lula gran
LLC	Leucèmia limfàtica crònica

LF	Limfoma Fol·licular
LH	Limfoma de Hodgkin
LM	Limfoma del Mantell
LNH	Limfoma no-hodgkin
LZM	Limfoma de la zona marginal
LZME	Limfoma de la zona marginal esplènica
LOH	<i>Loss of heterozygosity</i> , pèrdua d'heterozigositat
LPMCB	Limfoma primari del mediastí de cèl·lules B
miRNA	Micro RNAs
MALT	<i>Mucose associated lymphoid tissue</i> , teixit limfoide associate a la mucosa
OMS	Organització mundial de la salut
PALS	<i>Periarterial lymphatic sheaths</i> , beines limfoïdes periarterials
PHA	Fitohematoglutina
REAL	<i>Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms</i> , Classificació revisada des limfomes
RxFISH	<i>Cross-species color banding FISH</i>
SLPC-B	Síndrome limfoproliferativa crònica B
SLVL	<i>Splenic lymphoma with villous lymphocyte</i> , limfoma esplènic amb limfòcits vellosos circulants
SMD	Síndrome mielodisplàstic
SNC	Sistema nerviós central
SNPs	<i>Single nucleotide polymorphism</i> , polimorfismos de un solo nucleótido
SKY	Spectral Karyotype
UPD	Disomia uniparental
WCP	Whole Chromosome Painting
WHO	<i>World Health Organization</i> , Organització mundial de la salut
YACs	<i>Yeast Artificial Chromosome</i> . Cromosomes artificials de llevat.

LLISTAT DE TAULES

Taula 1. Les neoplàsies de cèl·lules B madures (OMS 2008).

Taula 2. Translocacions cromosòmiques característiques de les Neoplàsies de cèl·lules B madures.

Taula 3. Alteracions secundaries als LNH-B: freqüència de guanys i pèrdues detectades per HGC.

Taula 4. Limfoma marginal de la zona esplènic. Dades immunofenotípiques útils pel diagnòstic diferencial.

Taula 5. Alteracions citogenètiques descrites al LZME. Resum de les principals series.

Taula 6. Translocacions que impliquen el gen de les Immunoglobulines al LZME.

Taula 7. Alteracions més freqüents detectades mitjançant aCGH/SNP-a als LZME.

Taula 8. Avantatges i limitacions de la tècnica de CC i FISH.

Taula 9. Resum de les mutacions més freqüents al LZME observades mitjançant tècniques de seqüenciació massiva.

LLISTAT DE FIGURES

Figura 1. Sistema limfoide. Maduració dels limfòcits.

Figura 2. Esquema de l'estructura anatòmica d'un gangli limfàtic.

Figura 3. Esquema de l'anatomia de la melsa.

Figura 4. Esquema del reordenament dels gens de les IGHV.

Figura 5. Esquema de diferenciació dels limfòcits B.

Figura 6. Procés de diferenciació dels limfòcits B: estat dels gens de les immunoglobulines (IGH@, @IGK i @IGL) en els diferents estadis de diferenciació del limfòcit B.

Figura 7. Tall histològic tenyit amb Hematoxilina & Eosina (H&E) de la melsa d'un LZME amb patró bifàsic i infiltració de la polpa vermella (A). En detall, un centre germinal colonitzat pels limfòcits B petits tumorals amb una àrea marginal de cèl·lules més grans (B).

Figura 8. Limfòcits peluts (microvilli) a una sang perifèrica d'un LZME (x100).

Figura 9. Gens diana per mutacions a la via de NFκB al LZME.

Figura 10. Exemple de ideogrames amb bandes G dels cromosomes 1 (metacèntric), cromosoma 9 (submetacèntric) i cromosoma 14 (acrocèntric).

Figura 11. Etapes de la tècnica de FISH.

Figura 12. Principals sondes utilitzades en l'estudi de les neoplàsies hematològiques. a) Esquema de la hibridació d'una sonda de locus específic sobre un cromosoma; b) hibridació d'una sonda centromèrica sobre un cromosoma; c) hibridació d'una sonda telomèrica sobre un cromosoma; d) hibridació d'una sonda de pintat cromosòmic sobre un cromosoma.

Figura 13. Visualització de la hibridació sobre cromosomes i sobre nuclis en interfase d'una sonda de doble fusió. Dalt s'esquematitza el patró de hibridació normal i sota el patró alterat on s'observen dos senyals de fusió (groc), tant als cromosomes com als nuclis interfàsics.

Figura 14. Visualització de la hibridació sobre cromosomes i sobre nuclis en interfase d'una sonda de trencament o break-apart. Dalt s'esquematitza el patró de hibridació

normal i sota el patró alterat on s'observen les dos senyals verda i vermella separades, tant als cromosomes com als nuclis interfàsics.

Figura 15. Sequenciació automàtica del ADN.

1. INTRODUCCIÓ

1.1 LIMFOMAGÈNESI

El sistema limfoide normal humà està format per dos tipus d'òrgans:

- Òrgans limfoides primaris o centrals: en l'adult estan constituïts per la medul·la òssia i el timus. En aquests òrgans, s'originen els limfòcits B (a medul·la òssia) i el limfòcits T (al timus) a partir de cèl·lules mare hematopoètiques pluripotents, i posteriorment maduren sense necessitar la presència d'antígens.
- Òrgans limfoides secundaris o perifèrics: comprenen els ganglis limfàtics, la melsa i el teixit limfoide associat als epitelis mucosos dels tractes gastrointestinal, respiratori i genitourinari (anomenat MALT, de l'anglès *mucose associated lymphoid tissue*) i de la pell. En aquests òrgans s'inicien les respostes immunitàries, de forma que els limfòcits entren en contacte amb els antígens i amb les cèl·lules accessòries del sistema limfoide o cèl·lules presentadores d'antigen. Aquestes pertanyen al sistema dendrític i reben diferents noms segons el teixit on es troben (cèl·lules de Langerhans a la pell, cèl·lules dendrítiques fol·liculars als ganglis, etc) (Figura 1).

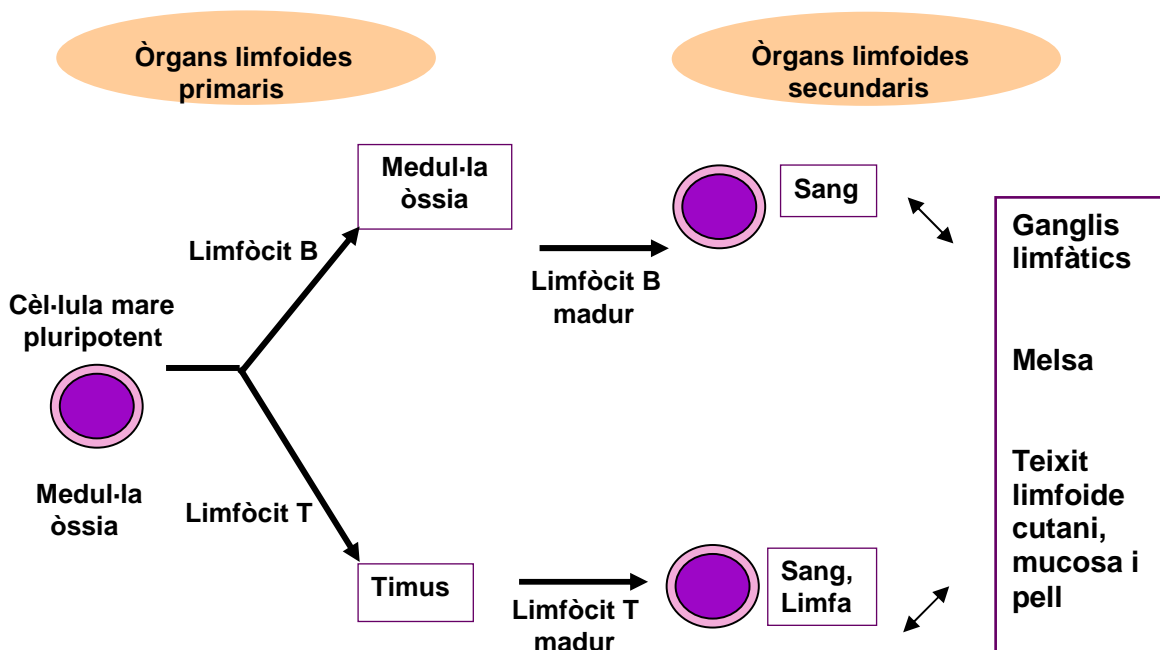


Figura 1. Sistema limfoide. Maduració dels limfòcits.

Els limfòcits B són els responsables de produir antígens com a resposta a l'estímul antigènic i els limfòcits T són els responsables de les respostes immunes produïdes per cèl·lules.

El procés de diferenciació dels limfòcits B i T es produeix en dos fases, una antígen-independent, que es produeix a la medul·la òssia i al timus, i una altre antígen-depenent. En la primera etapa les cèl·lules són cèl·lules mare (*stem cells*) amb capacitat d'autorenovar-se. En fases més avançades, les cèl·lules estan en repòs, amb una vida mitja molt llarga que pot oscil·lar des de setmanes a anys (Delves i Roitt, 2000A; Delves i Roitt, 2000B).

1.1.1 El gangli limfàtic

El gangli limfàtic està format per una càpsula de teixit connectiu a partir de la qual es formen septes que divideixen el gangli en diferents compartiments formats per un sinus subcapsular, diversos sinus medul·lars, fol·licles limfoides i cordons limfàtics, un sistema vascular sanguini i limfàtic i una estructura formada per cèl·lules reticulars (Figura 2).

L'estructura característica del gangli limfàtic consta d'una capa externa o càpsula, una escorça o zona B, una paraescorça o zona T i una capa interna o medul·la. A la zona de l'escorça se situen els fol·licles primaris, estructures arrodonides colonitzades per limfòcits B verges procedents de la medul·la òssia. Quan els limfòcits del fol·licle primari pateixen una estimulació antigènica es constitueixen els fol·licles secundaris. En aquests casos, els limfòcits estimulats esdevenen cèl·lules blàstiques i tendeixen a disposar-se al centre del fol·licle formant el centre germinal, i al seu voltant s'observa una corona de limfòcits petits que es denomina mantell fol·licular. Dins del centre germinal es diferencien dues zones, una zona fosca on es localitzen els centroblastes, una altra de clara basal, on es troben els centròcits i les cèl·lules fol·liculars dendrítiques, i una zona clara apical on es troben els centròcits i els precursors de les cèl·lules plasmàtiques. Als fol·licles secundaris també s'hi poden trobar cèl·lules dendrítiques fol·liculars, macròfags i algun limfòcit T (Woessner i Florensa, 2006). Les cèl·lules plasmàtiques i les cèl·lules

plasmocitoides, també anomenades limfoplasmòcits, constitueixen la fase final del procés de diferenciació del blast B del centre germinal. Els precursors de les cèl·lules plasmàtiques migren des del centre germinal cap a la medul·la òssia i pateixen una transformació a cèl·lula plasmàtica madura. Per altra banda, la cèl·lula plasmàtica també pot originar-se al gangli a partir del centròcit o de les cèl·lules de la zona marginal. En alguns òrgans limfoides secundaris com a la melsa, als ganglis mesentèrics i a les plaques de Peyer de l'intestí, es pot trobar una capa de cèl·lules que envolta el mantell fol·licular anomenada zona marginal.

Els fol·licles limfoides es troben envoltats per limfòcits T, disposats de forma difusa que constitueixen la zona paracortical o zona T. Aquesta zona conté moltes cèl·lules interdigitants procedents de la pell (cèl·lules de Langerhans) o de les mucoses (cèl·lules dendrítiques), que tenen nivells d'expressió molt elevats d'antígens de superfície del sistema d'histocompatibilitat de classe II i que transporten antígens processats des d'altres zones del cos cap als nòduls limfoides.

La zona més interna del gangli, la medul·la central, està formada per cordons cel·lulars (formats per limfòcits T i B, cèl·lules plasmàtiques i macròfags) separats per sinusoides limfoides que drenen al sinus terminal o hili, on s'origina el vas limfàtic eferent (Figura 2).

El gangli limfàtic posseeix una estructura constituïda per una xarxa de fibres reticulars que esdevenen el suport dels macròfags i les cèl·lules presentadores d'antígens.

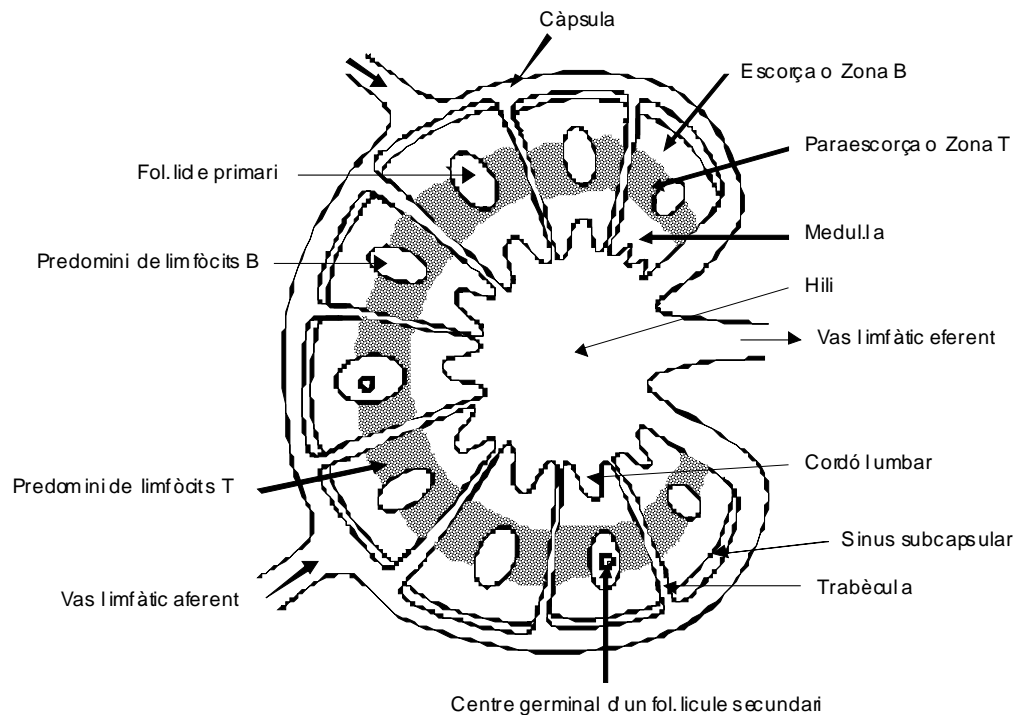


Figura 2. Esquema de l'estructura anatòmica d'un gangli limfàtic.

El funcionament normal del gangli limfàtic és el següent: els limfòcits procedents del torrent sanguini entren al gangli limfàtic pels vasos limfàtics aferents que penetren a través de la càpsula i desemboquen en el sinus subcapsular marginal. Des d'aquest punt, travessen l'endoteli de les vèdules postcapil·lars (també anomenades venes de l'endoteli de cèl·lules altes), fenomen que fa que la limfa circuli més lentament a aquest nivell i es faciliti la fagocitosi i els processos relacionats amb la formació d'anticossos.

El sinus subcapsular i els sinus medul·lars en disposició radial, que generalment se situen al llarg d'una trabècula, convergeixen als vasos limfàtics eferents a l'hili ganglionar. Des d'aquest punt, els limfòcits circulen cap el conducte toràcic i finalment van a parar a la circulació sanguínia.

1.1.2 La Melsa

La melsa està formada per una càpsula externa fibrosa més gruixuda a nivell de l'hili i des de la que s'origina l'estroma, teixit connectiu de suport de les trabècules que transporten els majors vasos sanguinis per tota la melsa. El parènquima de la melsa (o polpa) s'estructura en dos grans compartiments: la polpa vermella, teixit connectiu reticular envoltat per sinusoides esplènics àmpliament interconnectats; i la polpa blanca, formada per teixit limfoide. Envoltant aquesta última trobem teixit reticular ric en eritròcits, la zona perifol·licular (Wheater i cols., 1996; Sternberg, 1997).

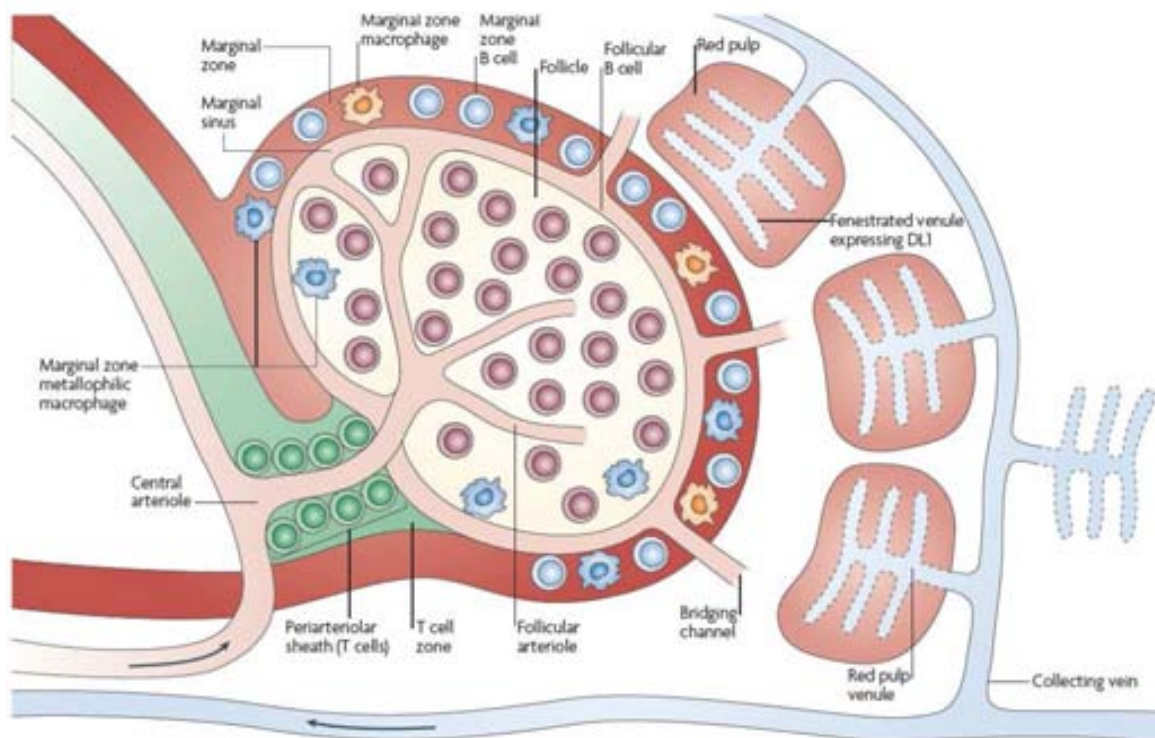


Figura 3. Esquema de l'anatomia de la melsa. (obtingut de la revista Nat Rev. Pillai i Cariappa i cols., 2009).

Polpa Blanca: L'artèria esplènica es ramifica quan entra per l'hili esplènic formant les artèries trabeculars que donen lloc a les arterioles. Dins el parènquima de la melsa les arterioles, que passen a anomenar-se arterioles centrals, queden envoltades per teixit limfàtic formant les beines limfoides periarterials (PALS, *periarterial lymphatic sheaths*), riques en limfòcits T. En el curs de les arterioles centrals trobem els corpuscles esplènics o fol·licles de cèl·lules B que consten de centre germinal, zona del mantell i zona marginal. La formació d'aquests fol·licles és indicatiu de resposta immune humoral, amb proliferació de limfòcits B i transformació a cèl·lules plasmàtiques. En molts casos l'arteriola central queda desplaçada cap a la zona marginal de la polpa blanca, zona de contacte amb la polpa vermella rica en macròfags i cèl·lules dendrítiques o presentadores d'antigen.

Polpa vermella: Ocupa el 75% del volum de la melsa, i està formada per plaques anastomòtiques, els cordons de Billroth, sostinguts per un estroma o xarxa reticular que conté una elevada població de macròfags i fibroblastes. Aquest estroma reticular és molt ric en capil·lars i sinusoides esplènics àmpliament interconnectats, i que representen el 30% de la polpa vermella. Els sinusoides estan entapissats per cèl·lules endotelials allargades i fusiformes formant un epitelí discontinu amb una làmina basal discontinua i abundants macròfags. Els eritròcits i altres cèl·lules sanguínies poden passar per aquests espais discontinus i circular cap i des de els cordons. Les cèl·lules fagocítiques dels cordons realitzen la destrucció final de les cèl·lules sanguínies envellides o danyades que circulen per aquesta "xarxa filtradora" de la melsa (Figura 3).

La melsa té una funció hemodinàmica, hematopoètica i hemostàtica: elimina eritròcits anòmals (eritrofagocitosi) i emmagatzema ferritina, intervé en la maduració dels reticulòcits i emmagatzema plaquetes i eritròcits. A més, també té una funció immunitària important.

1.1.3 Ontogènia dels limfòcits B

Els limfòcits B procedeixen d'una cèl·lula germinal limfoide pluripotent i esdevenen competents immunològicament a la medul·la òssia, al fetge fetal i possiblement a la

placenta, i actuen com a equivalents de la Bursa de Fabricius de les aus. Aquest procés està presidit pel reordenament dels gens de les immunoglobulines (Ig) i l'expressió a la membrana cel·lular dels receptors de reconeixement antigènic, les Ig de superfície (IgS). Cal recordar que les Ig tenen una unitat bàsica constituïda per dues cadenes pesades (γ , μ , α , δ i ϵ) i dues cadenes lleugeres (κ i λ). Cada cèl·lula B està compromesa a una cadena lleugera, κ o λ , i tota la seva descendència expressarà la mateixa cadena. Altres components del receptor de cèl·lules B són les molècules CD79a i CD79b.

Els gens de la regió variable (V), diversitat (D) i de unió (J) codifiquen per la regió variable de la cadena pesada de les Ig (*IGHV*) (figura 4) i constitueixen, junt amb la porció variable de la cadena lleugera de les Ig, el lloc de unió a l'antigen en el receptor de cèl·lules B (RCB). L'ús de determinats gens V i combinacions preferents amb gens específics D i J dona lloc a un RCB estereotipat (Murray i cols., 2008).

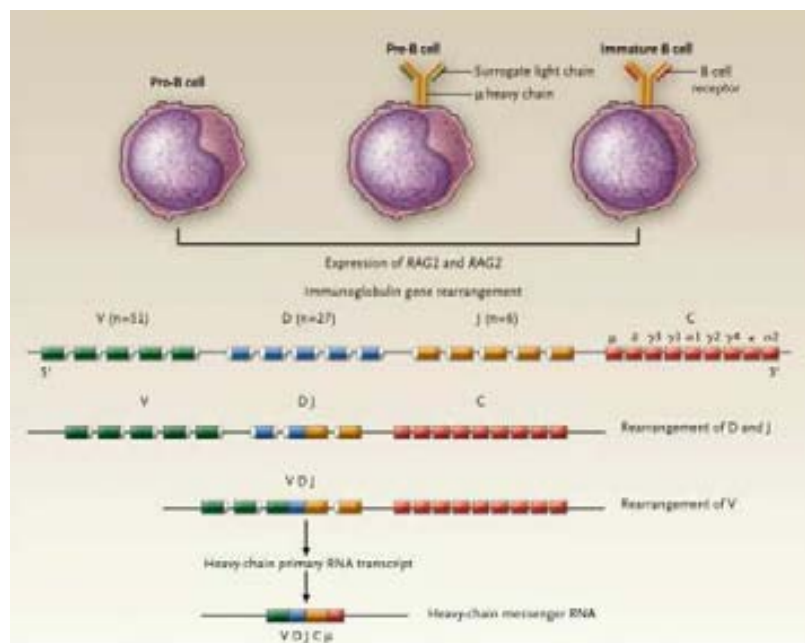


Figura 4. Esquema del reordenament dels gens de les *IGHV* (Chiorazzi i cols., 2005).

Els diferents estadis de maduració de la cèl·lula precursora B són principalment quatre:

- El precursor més immadur del limfòcit B es denomina limfòcit pro-B (o pre-pre-B) i és identificable fenotípicament mitjançant anticossos monoclonals. Aquesta cèl·lula expressa CD34, HLA-DR, CD10 (CALLA), CD19, CD24 i l'enzim TdT. A mida que el progenitor limfoide comú progressa cap el llinatge B, s'inicia el reordenament dels gens de les Ig, que comença per les cadenes pesades (H, *heavy*, mapades a 14q32.33) amb la recombinació dels segments D-J (cèl·lula pro-B inicial) i segueix amb la recombinació del segment V amb el complex D-J recombinat (cèl·lula pro-B tardana). Aquest estadi presenta reordenament, doncs, de la cadena H de la IgM, anomenada cadena μ , que representa la primera indicació de compromís amb la línia B, però encara no s'expressen immunoglobulines de superfície.

- El següent precursor en la línia de maduració és el limfòcit pre-B. Es passa a aquest estadi quan un segment recombinat V-D-J és productiu i dóna lloc a la síntesi de cadenes. Encara no s'expressen cadenes lleugeres ni immunoglobulines de superfície. En aquesta etapa encara hi ha expressió de TdT i CD10 i a més s'expressen els antígens HLA-DR, CD19 i CD24. Apareix l'expressió de CD20 i de la molècula específica de llinatge, el CD22. En aquesta fase s'expressa l'antigen leucocitari comú, el CD45. Aquests precursors B també expressen CD79a, molècula que associada a les IgS està implicada en la transducció de senyals per unió de l'antigen. En aquesta etapa podem detectar les cadenes pesades μ a l'interior del citoplasma, en absència de cadenes lleugeres i de Ig de membrana.

- A mida que la maduració va avançant, es perd el CD10 (que es tornarà a expressar quan el limfòcit sigui estimulat per un antigen). Posteriorment té lloc el reordenament dels gens de les cadenes lleugeres (L, *light*): en una primera etapa es reordenen els gens V-J del locus kappa (*IGK@*, mapat a 2p11.2), i si cap dels productes obtinguts és productiu, té lloc el reordenament del locus lambda (*IGL@*, mapat a 22q11.2). Quan un reordenament és productiu es sintetitzen les cadenes L, que s'uneixen amb les cadenes

μ i la cèl·lula passa a expressar IgM a la membrana. En aquest moment passem a denominar a aquests limfòcits: limfòcits B immadurs, amb IgM sense autoreactivitat, i que migren cap a la perifèria per a completar la seva maduració i esdevenir limfòcits B madurs.

- Els limfòcits B madurs passen a expressar també IgD a membrana. Aquest tipus cel·lular continua expressant CD19 i CD24, així com CD20 i CD22. També passa a expressar CD21, molècula que reconeix un epítip del receptor del complement CR2, que constitueix el receptor per al virus d'Epstein-Barr. Son també positius pel CD23 i algun poden expressar antígens pan-T CD5. Els limfòcits B verges o *naïve* expressen també la proteïna bcl-2, facilitant la seva supervivència (Figura 5).

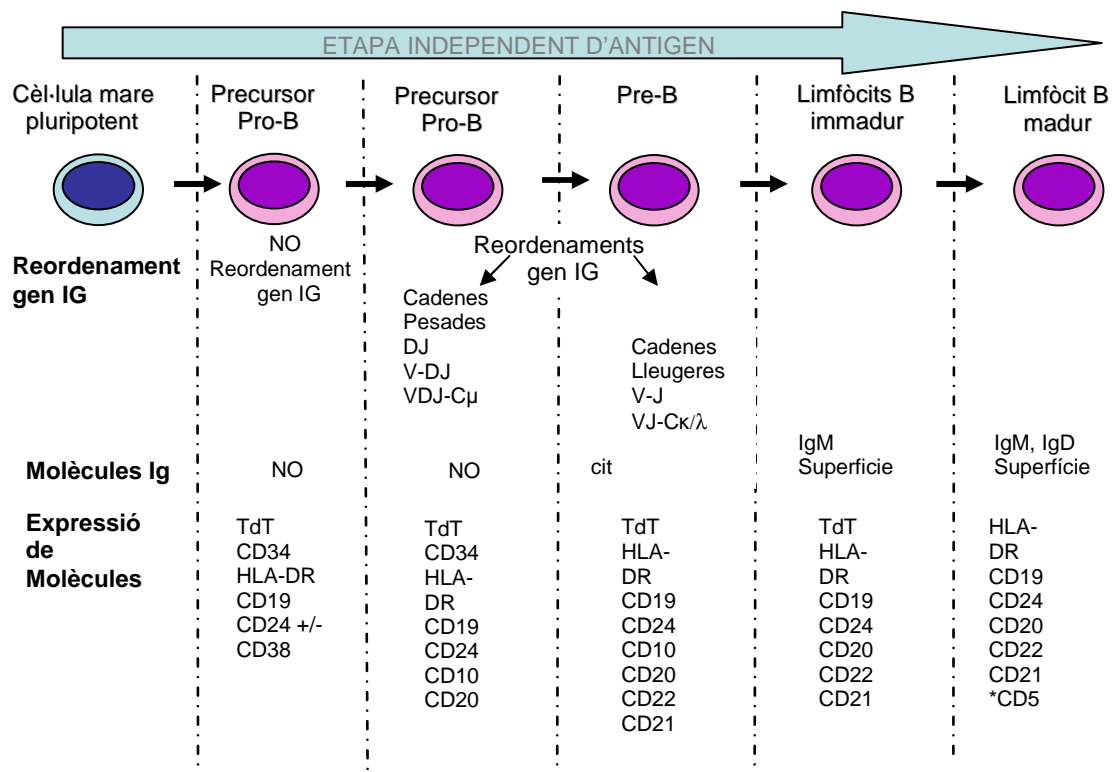


Figura 5. Esquema de diferenciació dels limfòcits B.

*present només a una sub població limfocitària circulant.

Els limfòcits B madurs *naïve* (mIgM+, mIgD+) passen de la medul·la òssia a la sang perifèrica, on representen només un 5-15% de la població limfocitària circulant, i es dirigeixen als òrgans limfoides secundaris on es situen les zones immunològicament B dependents.

Una part dels limfòcits B circulants (10-30%) de l'adult es caracteritzen per expressar la molècula CD5, antigen de diferenciació propi de les cèl·lules T madures. Aquests limfòcits són els primers que apareixen en l'ontogènia dels limfòcits B i durant la vida fetal predominen per sobre dels limfòcits CD5 negatius, així com en la infància fins els 7 anys. En l'adult aquesta població disminueix i se situa en els òrgans limfoides secundaris, a nivell del mantell fol·licular, al marge del centre fol·licular.

En els òrgans limfoides secundaris, quan el limfòcit B madur entra en contacte amb l'antigen, amb la cooperació del limfòcit T CD4+, té lloc un procés d'activació i proliferació que dóna lloc a una expansió clonal. Les cèl·lules B madures que no han rebut un estímul antigènic tenen els gens de les cadenes pesades de les Ig reordenats, però no mutats. Cada cèl·lula està compromesa a una cadena pesada i a una cadena lleugera determinades, i tota la seva progènie expressarà les mateixes cadenes. Mentre que els precursors B són cèl·lules proliferatives que donen lloc a limfòcits B madurs immunoincompetents, les cèl·lules verges es troben en fase de repòs fins que interaccionen amb l'antigen. Quan el limfòcit B madur *naïve* colonitza el fol·licle limfoide i entra en contacte amb l'antigen dóna lloc a cèl·lules blàstiques que entren en el fol·licle i formen el centre germinal. Els blastes proliferen i donen lloc al centroblastes, que no expressen IgS. Posteriorment, els centroblastes esdevenen centròcits, que tornen a expressar IgS. Els centròcits són estimulats per antígens presentats per les cèl·lules dendrítiques fol·liculars i s'activen. Llavors abandonen els fol·licles secundaris com a limfòcits B memòria o com a precursors de les cèl·lules plasmàtiques. La majoria dels precursors de cèl·lules plasmàtiques migren des del gangli cap a la medul·la òssia per transformar-se en cèl·lules plasmàtiques madures; una minoria poden madurar a cèl·lula plasmàtica en el propi fol·licle. Les cèl·lules plasmàtiques secretores d'immunoglobulines

representen l'estadi final de transformació antigènica del limfòcit petit B verge, i tenen com a característica la detecció d'Ig en el seu citoplasma.

El limfòcit B reconeix l'antigen quan entra al centre germinal gràcies a l'anticòs que té unit a la membrana cel·lular. Durant aquest procés, el seu ADN genòmic pateix hipermutacions. Durant aquest procés, l'ADN genòmic del limfòcit pateix una sèrie de canvis de nucleòtids, que poden determinar canvis en l'afinitat i especificitat de l'anticòs per l'antigen. Els limfòcits que pateixen hipermutacions somàtiques que augmenten la seva afinitat per l'antigen són seleccionats i sobreviuen, mentre que els limfòcits que les hipermutacions somàtiques els fan disminuir o perdre afinitat per l'antigen, entren en apoptosi i moren (Küppers i cols., 1999).

Alguns limfòcits B que surten del fol·licle tornen a l'estat quiescent del limfòcit B petit amb memòria immunològica i poden sobreviure mesos o anys. Aquestes cèl·lules presenten característiques morfològiques i immunofenotípiques indistingibles del limfòcit B madur, tot i que a la membrana ja no expressen IgD sinó IgG, IgM i IgG o IgA, i tenen activitat ATPasa i 5'-nucleotidasa. Aquests limfòcits passen a integrar-se al reservori de limfòcits B recirculants del mantell o corona, i en la resposta secundària a anticossos seran els precursors de les cèl·lules secretores d'anticossos. Alguns limfòcits B madurs que no han estat activats per antígens, es situen a les zones T del gangli i allà, després de rebre un estímul antigènic, esdevenen immunoblastes, cèl·lules que poden seguir el procés d'estimulació fins a cèl·lula plasmàtica (Figura 6) (Woessner i Florensa, 2006).

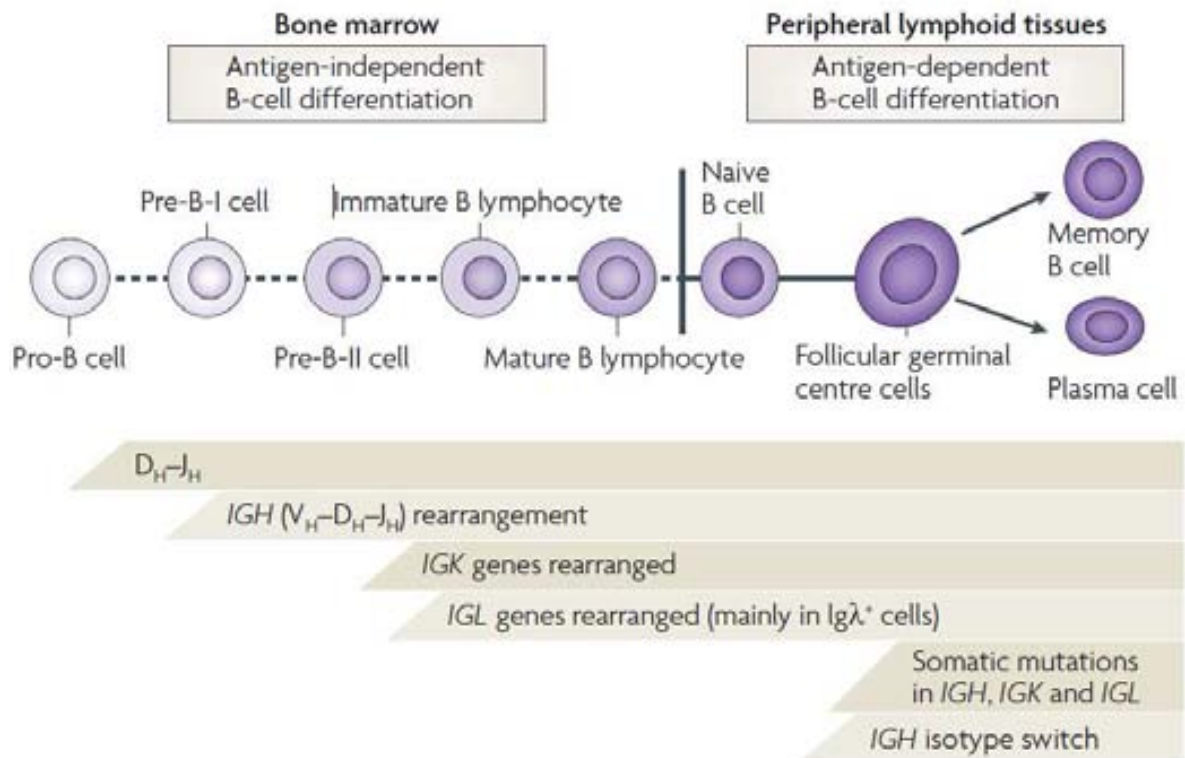


Figura 6. Procés de diferenciació dels limfòcits B: estat dels gens de les immunoglobulines (IGH , IGK i IGL) en el diferents estadis de diferenciació del limfòcit B. (Esquema extret de la revista Nat Rev Cancer. Jares P i cols., 2007).

1.2. NEOPLÀSIES DE CÈL·LULES B

1.2.1. Introducció

Les neoplàsies de cèl·lules B són proliferacions clonals de limfòcits que mimetitzen el diferents estadis de diferenciació de les cèl·lules B normals (des de cèl·lules verges a cèl·lules plasmàtiques madures). Anomenem limfoma a les neoplàsies que es produeixen per la proliferació de cèl·lules del sistema limfàtic, en qualsevol dels seus estadis de diferenciació. Es distingeixen dos categories principals de limfomes, els limfomes de Hodgkin (LH) i els limfomes no-Hodgkin (LNH). Dins el limfomes no-Hodgkin (LNH) els més freqüents són els de cèl·lules B (90%) i només un 10% dels casos són de cèl·lules T. El grup de LNH-B inclou diferents tipus de limfomes que es diferencien per la seva localització anatòmica, morfologia, expressió d'antígens de superfície i IG i alteracions genètiques.

1.2.2. Classificació de les neoplàsies de cèl·lules B

L'aparició de noves tecnologies com la immunologia, la citogenètica i la biologia molecular aporten una informació addicional no recollida en les anteriors classificacions. L'*International Lymphoma Study Group* (ILSG), varen crear una nova classificació que tingués en compte les noves aportacions d'aquestes tècniques. Es va arribar a la conclusió que la importància de cada una de les característiques varia per a cada una de les patologies, però no existeix un "únic principi" classificatori. El resultat del consens de l'ILSG va dur a l'aparició d'una nova classificació, la classificació REAL (*Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms*, Harris i cols., 1994). Aquesta classificació va resultar ser molt útil per definir, a la pràctica, les diverses entitats, però també va presentar alguns defectes. Des de 1995, els membres de les societats europea i americana d'hematologia van col·laborar a l'elaboració d'una nova classificació, la classificació de l'Organització Mundial de la Salut (OMS) (WHO, *World Health Organization Classification for Hematologic Malignancies*) (Harris i cols., 1999). Aquesta classificació ha patit diverses

revisions pels limfomes i s'ha usat també per la classificació de les neoplàsies mieloides i histiocitàries (Jaffe i cols., 2001; Swerdlow i cols., 2008).

Tant la classificació REAL com la Classificació de l'OMS diferencien tres categories principals dins de les neoplàsies del sistema limfoide: neoplàsies de cèl·lules B, neoplàsies de cèl·lules T/NK i malaltia de Hodgkin/limfoma de Hodgkin.

El treball que es presenta es basa en l'estudi del limfoma de la zona marginal esplènic (LZME), una síndrome limfoproliferativa crònica de cèl·lules B (SLPC-B). Aquesta entitat va ser descrita inicialment al 1992 (Schmid i cols., 1992) i considerada una entitat provisional per la REAL. Posteriorment, per les seves característiques clíniques i biològiques ben definides, va ser inclosa a la classificació de la OMS publicada al 2001 (Jaffe i cols., 2001) i es va diferenciar d'altres limfomes de la zona marginal (LZM nodal i del teixit limfoide associat a mucoses, MALT). Recentment, a la última revisió de la OMS al 2008 (Swerdlow i cols., 2008), s'ha descrit una nova entitat provisional, separada del LZME clàssic, el limfoma/leucèmia esplènic, no-classificable, que inclou el limfoma de cèl·lula B petita esplènic amb infiltració difusa de la polpa roja i la tricoleucèmia variant.

La classificació definitiva segons l'OMS 2008 de les neoplàsies limfoides B es mostra a la taula 1.

Taula 1. Les neoplàsies de cèl·lules B madures (OMS 2008).

Leucèmia limfocítica crònica/limfoma de cèl·lula petita
Leucèmia prolimfocítica de cèl·lula B
Limfoma de la zona marginal esplènica
Tricoleucèmia
<i>Limfoma/leucèmia esplènica, no-classificable</i>
<i>Limfoma de cèl·lula B petita esplènica i infiltració difusa de la polpa roja*</i>
<i>Tricoleucèmia variant*</i>
Limfoma limfoplasmocític
Macroglobulinèmia de Waldenström
Malalties de les cadenes pesades
Malaltia de la cadena Alfa
Malaltia de la cadena Gamma
Malaltia de la cadena Mu
Mieloma
Plasmocitoma solitari de l'os
Plasmocitoma extra ossi
Limfoma de cèl·lula B marginal extranodal del teixit limfoide associat a limfoma de mucosa (limfoma MALT)
Limfoma de cèl·lula B marginal nodal (MZL)
<i>MZL nodal de tipus pediàtric</i>
Limfoma fol·licular
<i>Limfoma fol·licular de tipus pediàtric</i>
Limfoma fol·licular cutani primari
Limfoma del mantell
Limfoma difús de cèl·lules grans B (DLBCL), no especificat
Limfoma de cèl·lula B ric en cèl·lules T/histiòcit
<i>DLBCL associat a inflamació crònica</i>
<i>DLBCL Epstein-Barr virus (EBV)+ de la gent gran</i>
Granulomatosis limfomatoide
Limfoma de cèl·lula gran B primari del mediastí (Tímic)
Limfoma de cèl·lula gran B intravascular
DLBCL primari cutani, de les cames
Limfoma de cèl·lula gran B ALK+
Limfoma plasmablastic
Limfoma efusió primària
<i>Limfoma de cèl·lula gran B associat a la malaltia de Castleman HHV8+</i>
Limfoma de Burkitt
<i>Limfoma de cèl·lula B, no-classificable, amb característiques intermitges entre limfoma difús de cèl·lula gran B i limfoma de Burkitt</i>
Limfoma de cèl·lula B, no-classificable, amb característiques intermitges entre limfoma difús de cèl·lula gran B i limfoma de Hodgkin clàssic

*Entitats o subtipus provisionals; Les patologies marcades en cursiva corresponen a les noves entitats incloses en la classificació de la OMS 2008

1.2.3. Alteracions cromosòmiques a les neoplàsies de cèl·lules B madures

L'aplicació de la citogenètica convencional a l'estudi dels limfomes ha estat i és bàsica per la troballa d'alteracions genètiques recurrents. Així, és ben conegut que les translocacions cromosòmiques que impliquen l'activació anòmala de proto-oncogens per juxtaposició amb seqüències reguladores del gen de les immunoglobulines (localitzats a:

IGH 14q32, *IGK*: 2p12 o *IGL*: 22q11.2) juguen un paper important en la limfomagènesi i s'associen a tipus específics de limfomes, permetent el seu ús diagnòstic (Seto, 2004) (Taula 2). Respecte al seu origen, recentment s'ha suggerit que aquestes translocacions son afavorides per errors en el programa de recombinació *V-D-J* del gen *IG* (en el cas dels LF i dels LM) o per errors al *class switching* i hipermutacions del gen *IG*, que es produeixen als centres germinals fol·liculars (en el cas del limfoma B difús de cèl·lula gran (LBDCG) i el limfoma de Burkitt (LB)). Altres models suggereixen que el primer event de la limfomagènesi és una modificació epigenètica aberrant d'alguns gens que permetrien a la cèl·lula adquirir comportaments de *stem-cell*. (Martinez-Climent i cols., 2010).

Taula 2. Translocacions cromosòmiques característiques de les Neoplàsies de cèl·lules B madures.

NEOPLASIA	ALTERACIÓ CITOGÈNÈTICA	GEN IMPLICAT	FREQÜÈNCIA
LF	t(14;18)(q32;q21) t(2;18)(p12;q21) t(18;22)(q21;q11)	<i>BCL-2</i>	85%
LDCGB	t(3;v)(q27;v)	<i>BCL-6</i>	30-40%
	t(14;18)(q32;q21)	<i>BCL-2</i>	20-30%
	t(8;14)(q24;q32)	<i>MYC</i>	>10%
LDCGB primari del SNC	t(3;v)(q27;v)	<i>BCL-6</i>	30-40%
LB	t(8;14)(q24;q32)		80%
	t(2;8)(p12;q24)	<i>MYC</i>	15%
	t(8;22)(q24;q11)		5%
Limfoma B no-classificable	t(v;18)(v;q21)	<i>BCL-2</i>	15%
Entre LBDCG i LB	t(8;v)(q24;v)	<i>MYC</i>	35-50%
LM	t(11;14)(q13;q32)	<i>CCND1</i>	90-100%
MALT	t(11;18)(q21;q21)	<i>API2/MALT1</i>	30-50%
	t(14;18)(q32;q21)	<i>MALT1</i>	5%
	t(1;14)(p22;q32)	<i>BCL10</i>	5%
	t(3;14)(p14;q32)	<i>FOXP1</i>	5%
Limfoma de cèl·lules B ALK+	t(2;17)(p23;q23)	<i>CLTC/ALK</i>	75%
	t(2;5)(p23;q35)	<i>ALK/NPM1</i>	17%
	t(2;?)(p23;?)	<i>ALK?</i>	8%

LF: limfoma fol·licular; LDCGB: limfoma difús de cèl·lula grans B; SNC: sistema nerviós central; LB: limfoma de Burkitt; LM: Limfoma del Mantell; MALT: teixit limfoide associat a mucoses.

D'altra banda, es coneix que les translocacions cromosòmiques per si soles no són les causants de malignitat, encara que confereixen a les cèl·lules una major taxa de

proliferació, inhibició de la diferenciació i activitat anti-apoptòtica (Bernicot i cols., 2007). Són, per tant, les alteracions secundàries addicionals a les translocacions cromosòmiques (guanys, pèrdues i amplificacions de regions específiques) les que confereixen una major agressivitat al tumor. Aquestes alteracions secundàries són un indicador de inestabilitat genètica i tenen influència en la evolució d'un limfoma (Johansson i cols., 1995). Així, en molts tipus de limfomes un elevat número d'alteracions secundàries s'associa a un pitjor pronòstic (Beà i cols., 2008). Per tant, és necessari un estudi citogenètic complet per tal de conèixer alteracions addicionals a les purament diagnòstiques. Durant els últims anys, la tècnica de hibridació genòmica comparada (HGC) ha complementat la citogenètica convencional en l'estudi d'alteracions secundàries, degut a que permet caracteritzar fàcilment i d'una manera fiable guanys i pèrdues de material genètic a partir de ADN, sense necessitat de realitzar un cultiu de la mostra (Kallioniemi A i cols., 1992). Els arrays de BACs (*bacterial artificial chromosomes*), oligonucleòtids o SNPs (*single nucleotide polymorfism*), introduïts més recentment, augmenten la resolució en la detecció d'aquestes alteracions (Beà i cols., 2005; Beà i cols., 2008). A la taula 3 es recullen les alteracions secundàries més freqüents als diferents tipus de limfomes B. Entre un 70-90% dels limfomes B presenten alteracions secundàries. La leucèmia limfàtica crònica (LLC) és la neoplàsia B amb el menor número de pacients amb alteracions (63%) i menor número de canvis genètics per cas (2.5 alteracions). En canvi, el limfoma del mantell (LM) presenta el major número de pacients amb alteracions (93%) amb una mitja de 5 alteracions per cas (Beà i cols., 2008).

Taula 3. Alteracions secundàries als LNH-B: freqüència de guanys i pèrdues detectades per HGC (Beà i cols., 2008).

	GUANYS%								PÈRDUES%							
	1q+	2p+	3q+	7p+	8q+	9p+	12q+	18q+	1P-	6q-	7q-	8p-	9p-	11q-	13q-	17p-
LLC	--	--	--	--	--	--	--	65	LLC	--	--	--	--	24	65	32
LM	--	--	70	27	32	--	30	26	LM	33	37	--	33	30	36	63
LF	10	10	10	21	--	--	18	29	LF	25	21	--	--	--	--	15
LEZM	11	--	31	--	--	--	18	11	LEZM	--	10	16	--	--	--	10
LDCGB ABC	12	15	33	10	10	--	--	34	LBDCG ABC	--	40	--	10	--	--	18
LDCGB CGB	10	17	--	15	11	--	33	10	LBDCG CGB	--	22	--	--	--	--	--
LPMCB	--	47	16	--	11	56	--	16	LPMCB	--	--	--	16	--	--	--
LB	43	--	--	--	--	--	26	--	LB	--	--	--	--	--	17	--

LLC: Leucèmia limfàtica crònica; LM: Limfoma del Mantell; LF: limfoma fol·licular; LZME: limfoma de la zona marginal esplènica; LDCGB-ABC: limfoma difús de cèl·lula grans de cèl·lules B activades; LDCGB-CGB: limfoma difús de cèl·lula grans del centre germinal; LPMCB: limfoma primari del mediastí de cèl·lules B; LB: limfoma de Burkitt.

Malgrat la variabilitat, existeixen alteracions secundàries comuns entre els diferents LNH-B. Per exemple, els guanys de 3q són freqüents al LM, LZME i al LBDCG, i les pèrdues de 13q14 a la LLC i al LM. Tot i així, és difícil establir una regió mínima d'alteració entre els diferents tipus de LNH-B i fins i tot dins de cada grup de limfomes. En algunes regions comunament alterades a diferents LNH-B s'han identificat gens supressors de tumors com el gen *TP53* (17p13) i els gens *CDKN2A* i *CDKN2B* (9p21) que es consideren alteracions d'alt risc perquè s'associen progressió de la malaltia (Jardin i cols., 2010; Bea i cols., 1999). A més a més, les pèrdues de 11q22-23 són un factor pronòstic advers a la LLC (Zenz i cols., 2007), així com les delecions de 6q25-27 són predictores de menor supervivència al LF (Viardot i cols., 2002). Al LM el guany de 3q, les pèrdues de 8p, 9p21, 9q i 13q14 s'han associat a una menor supervivència (Salaverria i cols., 2007; Espinet i cols., 2010). Als LDCGB el guany/amplificació de la regió 18q21 (que inclou els gens *BCL2* i *MALT1*) s'associa a una supervivència escurçada i a un elevat risc de recaiguda (Beà i cols., 2004; Dierlamm i cols., 2008).

1.3. LIMFOMA DE LA ZONA MARGINAL ESPLÈNIC (LZME)

1.3.1. Introducció i epidemiologia

El LZME és un tipus de limfoma B poc freqüent (<2% de tots els LNH-B) caracteritzat per la presència d'esplenomegàlia i que en la majoria de casos es presenta amb expressió hemoperifèrica i afectació del moll d'os.

El LZME afecta fonamentalment a individus de més de 50 anys amb una distribució similar entre ambdós sexes (Franco i cols., 2003; Matutes i cols., 2009). Clínicament aquesta malaltia presenta un curs indolent amb una mitjana de supervivència que excedeix els 10 anys, tot i que un subgrup de pacients (un terç dels malalts) poden presentar una evolució més agressiva de la malaltia amb una mitjana de supervivència de 2-3 anys i un 10% es transformen a limfoma difús de cèl·lula gran B (Arcaini i cols., 2010). A més de l'esplenomegàlia i la presència de limfòcits atípics a sang perifèrica, alguns pacients amb LZME presenten anèmia i trombocitopènia. El moll d'os està invariablement infiltrat però la infiltració extraganglionar i la presència d'adenopaties perifèriques son infreqüents. Aproximadament un terç dels pacients presenten un component monoclonal sèric. S'ha descrit l'associació del LZME amb la infecció pel virus de la hepatitis C (HCV) (Arcaini i cols., 2006).

1.3.2. Característiques histològiques, morfològiques i immunofenotípiques

El LZME implica la substitució, per part de limfòcits de mida petita, dels centres germinals de la polpa blanca. El diagnòstic de LZME es realitza en base al patró d'infiltració de la melsa. La majoria dels pacients presenta un patró bifàsic; una proliferació de limfòcits B petits que envolten i reemplacen els centres germinals i les zones del mantell fol·licular de la polpa blanca i, perifèricament, es fusionen amb una àrea perifèrica de cèl·lules mitjanes/grans, amb citoplasma abundant i pàl·lid similars a les de la zona marginal, amb alguna cèl·lula d'aspecte blàstic. Posteriorment el limfoma progressa cap a la polpa vermella en forma de infiltrats micronodulars (Figura 7). Alguns pacients poden presentar

un marcat predomini de cèl·lules grans “similars a les de la zona marginal”. També podem trobar casos amb diferenciació plasmocítica, i casos amb un patró d’infiltració fol·licular (Duong van Huyen i cols., 2000; Mollejo i cols., 2009). En aquests casos és essencial el diagnòstic diferencial amb altres tipus de LNH. La transformació a un limfoma de cèl·lules grans també es pot donar als pacients amb un LZME (Dungarwalla i cols., 2008).

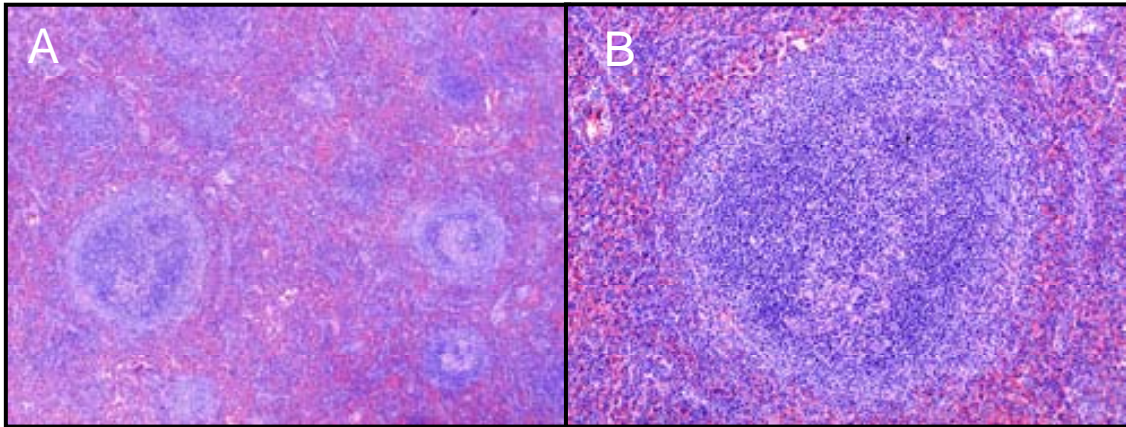


Figura 7. Tall histològic tenyit amb Hematoxilina & Eosina (H&E) de la melsa d'un LZME amb patró bifàsic i infiltració de la polpa vermella (A). En detall, un centre germinal colonitzat pels limfòcits B petits tumorals amb una àrea marginal de cèl·lules més grans (B).

A la pràctica, l'esplenectomia només es factible a un terç dels malalts amb LZME (als altres pacients l'esplenectomia clínicament no està indicada o no presenten esplenomegàlia). En aquests casos el diagnòstic és difícil i s'estableix mitjançant l'estudi de la histologia del moll d'os, l'estudi morfològic a sang perifèrica, l'immunofenotip i la citogenètica. Recentment, el Grup de Limfomes Esplènics (SLBG) ha publicat un document consens (Matutes i cols., 2008) al qual s'estableixen les proves que s'han de realitzar per garantir el diagnòstic d'aquesta entitat en aquells pacients que no disposen de histologia esplènica.

El patró d'infiltració del moll d'ós és freqüentment micronodular, intersticial i, en algunes ocasions paratrabecular. S'observa en aquests malalts un patró d'infiltració intrasinusoidal

peculiar, característic del LZME, tot i que també s'ha observat en menys freqüència a altres tipus de limfoma (Franco i cols., 1996).

A sang perifèrica, les cèl·lules tumoral es caracteritzen per presentar petites prolongacions citoplasmàtiques (*microvilli*) (Figura 8) i algunes amb aspecte plasmocitoide. Per aquest raó el LZME amb expressió perifèrica es coneix com a limfoma amb limfòcits vellosos circulants esplènic (*splenic lymphoma with villous lymphocytes*; SLVL), tot i que s'ha utilitzat a la literatura independentment de l'aspecte morfològic dels limfòcits del LZME (Melo i cols., 1987).

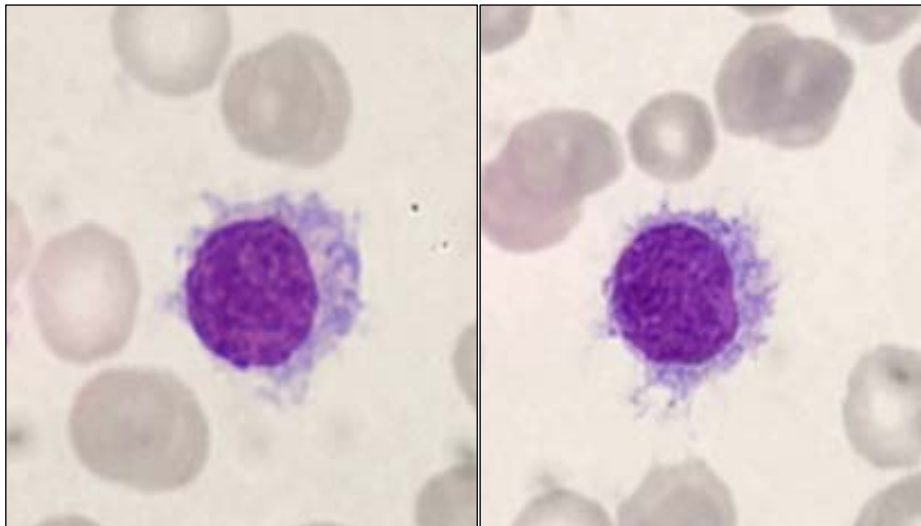


Figura 8. Limfòcits peluts (*microvilli*) a una sang perifèrica d'un LZME (x100).

Per citòmetre de flux, les cèl·lules B clonals expressen marcadors de superfície IgM i IgD i son CD19⁺, CD20⁺, CD22⁺, CD79a⁺, FMC7⁺, CD10⁻, CD43⁻, CD123⁻; CD103⁺ (10%), CD11c⁺ (50%), CD23⁺ (30%), i CD5 pot ser positiu en un subgrup de casos (20-25%) (Matutes i cols., 1994; Matutes i cols., 2008). Per immunohistoquímica, Anexina A1 i Ciclina D1 són marcadors negatius en aquesta entitat. Els LZME rarament co-expressen CD5 i CD23, la qual cosa exclou el diagnòstic de leucèmia limfàtica crònica (LLC). En els LZME CD5⁺ sense histologia esplènica es planteja el diagnòstic diferencial amb el limfoma del mantell (LM) de curs clínic indolent, que habitualment es presenta amb

esplenomegàlia i expressió leucèmica, sense adenopaties perifèriques (Fernández i cols., 2010). També els LZME CD5+ s'han de distingir dels LM sense t(11;14)(q13;q32), ciclina D1 (CCND1) negatius (Fu i cols., 2005). Recentment s'ha descrit l'expressió específica de SOX11 al LM, la qual cosa permet la identificació d'aquest subgrup CCND1 negatiu (Mozos i cols., 2009) i s'han descrit també translocacions que afecten les ciclins D2 i D3 (CCND2 i CCND3) en LM CCND1 negatius (Wlodarska i cols., 2008; Quintanilla-Martínez i cols., 2009). L'absència d'expressió de SOX11 i de translocacions que afecten CCND1, CCND2 o CCND3, donarien suport al diagnòstic de LZME CD5+. L'absència d'Anexina A1 al LZME exclou del diagnòstic diferencial a la tricoleucèmia i la negativitat per CD10 i BCL6 ajuda a excloure el limfoma fol·licular (LF) (Taula 4).

Taula 4. Limfoma marginal de la zona esplènica. Dades immunofenotípiques útils pel diagnòstic diferencial.

	LZME	LLC	LM	LF	HCL	HCL-v	MALT
IgM	+++	+/-	+++	+++	+++	+++	+++
CD5	+	+++	+++	-	-	-	-
CD23	+	+++	-	+	-	-	-
FMC7	+++	-	+++	+++	+++	+++	+++
CD11c	++	-	-	-	+++	+++	-
CD103	-	-	-	-	+++	++	-
CD123	-	-	-	-	+++	-	-
CD25	+	-	-	-	+++	-	-
CD27	++	+++	+++	+++	-	++	+

LZME: limfoma esplènica de la zona marginal; LLC: Leucèmia Limfàtica Crònica; LM: Limfoma de Cèl·lules del Mantell; LF: Limfoma fol·licular; HCL: Tricoleucèmia; HCL-v: Tricoleucèmia variant; MALT: Limfoma extranodal associat a les mucoses.

-, menys del 10% de casos positius; +, 11-35% casos positius; ++, 36-75% casos positius; +++ >75% casos positius.

1.3.3. Estat mutacional dels gens de les immunoglobulines

Estudis dels gens que codifiquen per la regió variable de les cadenes pesades de les immunoglobulines (*IGHV*) al LZME evidencien que aquesta entitat és heterogènia respecte a l'ús preferencial del repertori de famílies *IGHV*, així com per l'estat mutacional. Aproximadament un 50% dels LZME presenten mutacions dels gens *IGHV*, amb predomini del gen *VH1-2*, seguit pels gens *VH3-23* i *VH3-30* i *VH3-34*. (Algara i cols., 2002; Arcaini i cols., 2009). El impacte pronòstic de l'estat mutacional de *IGHV* està en discussió (Hockley SL i cols., 2012).

L'origen cel·lular dels limfòcits B patològics no està clar, tot i que l'ús selectiu de certes seqüències suggereix que han patit selecció antigènica (Kalpadakis i cols., 2009). Recentment s'ha suggerit que el procés de hipermutació en aquests casos té lloc fora del centre germinal per tal d'escapar del mecanisme de destrucció per part dels limfòcits B autoreactius que hi ha al centre germinal (Papadaki i cols., 2007).

1.3.4. Característiques citogenètiques i moleculars

Hi ha descrites diverses series de pacients diagnosticats d'un LZME amb dades citogenètiques. Fonamentalment els pacients estudiats presenten malaltia activa i requereixen esplenectomia (Taula 5).

Aproximadament un 70-80% dels pacients amb un LZME presenten alteracions citogenètiques i/o moleculars, però sense que s'hagi descrit una específica d'aquesta patologia. Entre un 50-60% dels cariotips alterats són complexes, amb més de tres cromosomes implicats, entre ells els més freqüents: 1, 3, 7, 8 i 14. Les anomalies citogenètiques més freqüents són la deleció del braç llarg del cromosoma 7 (bandes 7q22 a 7q36) seguida pel guany del cromosoma 3 ó del braç llarg del cromosoma 3 (3q), però ni són exclusives d'aquesta entitat ni la trobem a tots els pacients (Oscier i cols., 1993; Dierlamm i cols., 1996A; Dierlamm i cols., 1996B; Troussard i cols., 1998; Solé i cols., 2001; Callet-Bauchu i cols., 2005).

Taula 5. Alteracions citogenètiques descrites al LZME. Resum de les principals series.

SERIES	N	CARIOTIP ALTERAT (%)	ALTERACIONS CITOGENÈTIQUES
<i>Oscier i cols., 1993</i>	31	87	t(11;14)(q13;q32), 7q-, i(17q), t(2p11)
<i>Dierlamm i cols., 1996</i>	10	70	Guany del cromosoma 3
<i>Troussard i cols., 1998</i>	44	43	alteracions de 14q, t(11;14)(q13;q32),+3, +12 i alteracions de 17p (TP53)
<i>Gruzka-Westwood i Cols., 2001</i>	59	17	Deleció gen TP53 (FISH)
<i>Solé i cols., 2001</i>	47	70	7q-, +3/+3q i implicació dels cromosomes 1 i 8
<i>Callet-Bauchu i cols., 2005</i>	77/103*	100**	+3/+3q, 7q-, +18/18q, 6q-, +12/+12q, 8p-

*Es van estudiar 103 limfomes marginals No-MALT, 77 dels quals eren LZME. **En aquesta sèrie es van seleccionar els pacients amb cariotip alterat

Les delecions de 7q tenen una incidència del 26% al 40% per citogenètica convencional (Oscier i cols., 1996; Troussard i cols., 1996; Solé i cols., 2001) i d'un 40-79% si utilitzem per a la seva detecció un panell de microsatèl·lits de la regió 7q21 a 7q36 (Mateo i cols., 1999; Gruska-Weswood i cols., 2003). Aplicant tècniques de FISH amb sondes no comercials i anàlisi de microsatèl·lits, s'ha observat que la regió més comunament delecionada és 7q31-q32 tot i que s'observen delecions més centromèriques i telomèriques a aquesta regió (Hernández i cols., 1997; Gruska-Weswood i cols., 2003; Boonstra i cols., 2003). Estudis recents mitjançant HGC o arrays genòmics (aHGC), amb una resolució superior a la citogenètica convencional, confirmen les delecions a 7q (7q31-q32) com l'alteració més freqüent, tot i que presenten la limitació de incloure un baix número de pacients (Andersen i cols., 2005; Vega i cols., 2008 ; Novara i cols., 2009). Els

gens *POT1* (*protection of telomere 1*) localitzat a 7q31.32 i *SHH* (sonic hedgehog) localitzat a 7q36.2 s'han descrit com a gens candidats implicats en aquesta patologia (Vega i cols., 2008). Recentment Robledo i cols. (2012) han descrit i caracteritzat mitjançant aHGC la deleció de la regió 7q22.1 com una altre regió comunament alterada als LZME. Les translocacions de 7q són poc freqüents. Corcoran i cols. (1999) descriuen quatre pacients diagnosticats de LZME, tres d'ells presenten una translocació t(2;7)(p12;q21.2) i un pacient una t(7;21) (q21.2;q22). En aquesta regió 7q21.2 es localitza el gen de la ciclina *CDK6* (*cyclin dependent kinase 6*), proteïna que es va observar sobreexpressada en 2 d'aquests 4 pacients. CDK6 juntament amb CDK2 i CDK4 regulen positivament el pas de la fase G1 a S del cicle cel·lular mitjançant la fosforilació de la proteïna del retinoblastoma (rb). Aquest fet comporta l'alliberació de E2F, factor de transcripció que controla l'entrada a fase S. Aquestes ciclins dependents de cicle (CDKs) es troben regulades negativament per dues famílies de inhibidors de CDKs que inclouen el grup INK4 (p15, p16, p18, p19) i el grup Cip/Kip (p21 i p27). Aquest estudi suggereix que la sobreexpressió de CDK6 podria contribuir a la patogènesi del LZME, tot i que la incidència d'aquestes alteracions és molt baixa. Recentment s'han descrit a aquesta regió de 7q32 dos microRNAs, *miR-29b-1* i *miR-29a*, que regulen el gen *TCL1*, freqüentment sobreexpressat al LZME (Ruiz-Ballesteros i cols., 2007). A la taula 7 es llisten altres gens localitzats a 7q que poden estar implicats en la patogènesi del LZME.

La incidència de la trisomia 3 en el LZME varia considerablement entre les diferents series citogenètiques d'un 2% a un 36% (Oscier i cols., 1993; Troussard i cols., 1996; Gruska-Weswood i cols., 1999; Solé i cols., 2001). Es produeix sovint en forma de guany del braç llarg del cromosoma 3 (3q), en alguns casos com a resultat d'una translocació no balancejada amb un altre cromosoma. Els cromosomes implicats en aquestes translocacions són: 1, 6, 7, 8, 11, 13, 14, 15, 17, 18, 19 i 21, (Solé F i cols., 2001; Gazzo i cols., 2003). No s'ha descrit cap translocació de 3q amb el gen de les immunoglobulines (*IG*), encara que si s'han descrit translocacions amb 7q31 i 7q34-35, implicant una trisomia parcial 3q i una deleció de 7q simultàniament. No és estrany, per tant, trobar

coexistència d'aquestes dues alteracions. Gazzo i col. (2003) aplicant FISH en 14 limfomes de la zona marginal (LZM), 13 d'ells d'origen esplènic, van observar que la regió 3q13.32-3q29 era la més comunament guanyada, suggerint que l'efecte de dosi, més que l'alteració en algun gen específic d'aquesta regió, podria jugar un paper important en la patogènesi del LZME (Gazzo i cols., 2003). Mitjançant la tècnica d'HGC, les regió del cromosoma 3 més representades són 3q23-25 i 3q25-29 (Hernández i cols., 1997). La trisomia 3, freqüent als limfomes marginals en general, es correlaciona amb un curs indolent de la malaltia. No obstant això, s'ha especulat sobre el paper de la trisomia 3 en la transformació del LZME (Martinez-Climent i cols., 2003).

Altres alteracions recurrents al LZME però menys freqüents (<5%) son les translocacions que impliquen als gens de les cadenes pesades (*IGH*) o lleugeres (*IGK* o *IGL*) de les immunoglobulines (localitzats a 14q32, 2p12 i 22q11, respectivament) (Solé i cols., 2001) (Taula 6). Els oncogens afectats són: la ciclina D3 (*CCND3*), implicada en el pas de la fase G1 a S del cicle cel·lular; *BCL-3*, disregulat per translocació amb *IGH* també a la "LLC de morfologia atípica", leucèmies de limfòcits B CD5+ no-classificables i altres neoplàsies de cèl·lules B; i *CDK6* implicat el control del cicle cel·lular.

Taula 6. Translocacions que impliquen el gen de les Immunoglobulines al LZME.

TRANSLOCACIÓ	GENS
t(6;14)(p21;q32)	<i>CCND3</i> (6p21)
t(14;19)(q32;q13)	<i>BCL-3</i> (19q13)
t(2;7) (p12;q21.2)	<i>CDK6</i> (7q21.2)

Referències: *CCND3*: Sonoki i cols., 2001; *BCL-3*: Martin-Subero i cols., 2007; *CDK6*: Sonoki i cols., 2001; Brito-Pabapulle i cols., 2002)

Delecions de la regió 17p13 (on es localitza el gen *TP53*) són poc freqüents al LZME (<5%) (Gruszka-Westwood i cols., 2001), i alteracions que afecten al gen *ATM* (11q23), freqüents a la LLC i al LM, no s'han detectat a una serie de 16 pacients diagnosticats de LZME (Salido i cols., 2003).

Per altre banda, el recull de dades dels estudis d'HGC sobre cromosomes (3-10Mb de resolució) posen de manifest la elevada heterogeneïtat genètica en aquests tipus de limfoma. Els desequilibris observats amb més freqüència són els guanys de 3q i 12q, i la pèrdua de 7q. Amb menys freqüència es van detectar guanys de les regions 5q, 12p, 20q i 9q, i pèrdues de 6q23 i 14q22-q24.22 (Hernandez i cols., 2001; Andersen i cols., 2005). Estudis mitjançant aHGC i arrays de *single-nucleotide polymorphism* (SNP-a) han permès caracteritzar amb més resolució aquestes regions freqüentment alterades als LZME i descriure de noves. Les alteracions més freqüents en aquesta patologia es detallen a la taula 7 (Vega i cols., 2008, Novara i cols. 2009, Watkins i cols., 2010; Rinaldi i cols. 2011, Robledo i cols. 2012).

Recentment, s'han utilitzat els microarrays d'expressió amb la finalitat d'obtenir una patró molecular característic que ens permeti fer distinció entre els diferents tipus de limfomes B de cèl·lula petita no centre-germinals (Thieblemont i cols., 2004; Ruiz-Ballesteros i cols., 2005). D'aquests resultats s'extreu que el LZME presenta un perfil d'expressió homogeni i característic, la qual cosa implica l'existència d'una entitat molecular única que es diferencia del LM, LLC i del LF. El perfil d'expressió del LZME és caracteritzat per la sobreexpressió de gens implicats en la via de senyalització de *AKT1*, implicat en supervivència cel·lular mitjançant la inhibició de l'acció de proteïnes pro-apoptòtiques (BAD, FKHR, caspasa 9). Altres gens sobreexpressats són els implicats en la via de senyalització del receptor de cèl·lules B (BCR), en la via del factor de necrosi tumoral (TNF) i en la via d'activació de NFκB. En contrast, els gens *CAV1*, *CAV2* i *GNG11* situats a 7q31, un àrea comunament delecionada als LZME, s'observen infraexpressats (Ruiz-Ballesteros i cols., 2005). La comparació de la signatura d'expressió del LZME amb la signatura d'altres limfomes B de cèl·lula petita ha permès identificar 3 gens, *ILF1*, *SENATAXIN*, i *CD40*, que distingeixen el LZME (Ruiz-Ballesteros i cols., 2005). En un estudi recent s'ha demostrat que la via de NFκB està constitutivament activada a la majoria de LZME (60%) i que aquesta activació ve impulsada per alteracions genètiques a reguladors d'aquesta via de senyalització com: *TNFAIP3*, *IKBKB*, *BIRC3*, *TRAF3* i

MAP3K14 (Rossi i cols., 2011) (Figura 9). Alteracions genètiques a la via NFκB proporcionen una base molecular nova per a la patogènesi del LZME i ofereix noves estratègies terapèutiques amb inhibidors d'aquesta via com el Bortezomib (Arcaini i cols., 2012).

Taula 7. Alteracions més freqüents detectades mitjançant aCGH/SNP-a als LZME.

	N	GUANYS	PÈRDUES	GENS
<i>Vega i cols. 2008</i> <i>aCGH</i>	8	9p13-p21 +12 13q21-q33 16p13.1	7q22-q36 7q31-q36 7q31.33 14q23-q24	<i>POT1</i> (7q31.32) <i>SHH</i> (7q36.2)
<i>Novara i cols. 2009</i> <i>aCGH</i>	24	3q21.1-q29 12q13.1- q21.31 17q24.1-qter 18q11-qter Xpter-p11.23	1p36.21-p35.3 7q31.1-q32.3 8p21.3-p12 13q14.2-q14.3 17pter-p12	miRNA29a (7q31)
<i>Watkins i cols. 2009</i> <i>BAC-array</i>	25	3q26.2-q28 9q34 12q23-q24 18	6q 7q32.1-q32.2 8p 17p13	<i>SND1, IRF5,</i> <i>hNIPA, TSPAN33,</i> <i>cluster de</i> <i>miRNAs</i> (7q32.1-q32.2)
<i>Rinaldi i cols. 2011</i> <i>SNP-a</i>	134	3q13.3-q29 6q27 8p23.1-p22 9p31.1 12q21.31 13q11-q12.11 18q23 21p	1p36.21-p36.13 4p12-p11 7q31.31-q32.3 8p 17p13.3-p13.1	<i>NFKBIZ, BCL6</i> (3q13.3-q29) <i>POT1</i> (7q31.32) miRNA29a (7q31) miRNA29b (7q31) <i>NFATC1</i> (18q23) <i>TP53</i> (17p13)
<i>Robledo i cols. 2012</i> <i>BAC-array</i> <i>aCGH</i>	57	3 5q13.2 6p22.1-p21.1 8q 17q 18	4q28.3-q31.23 7q22.1 7q31-q35 10q24.33-q25.3 15q15.1-q21 17p13.3-p13	<i>MUC3, MUC12,</i> <i>CUX1</i> (7q22.1) <i>MET, ST7</i> (7q31-q35)

La incidència de la t(11;14)(q13;q32) al LZME varia segons les sèries d'un 0 a un 16% (Oscier i cols., 1993; Troussanrd i cols., 1998; Solé i cols., 2001). A l'estudi de Thiblemont i cols., dos dels LZME presentaven la t(11;14)(q13;q32), típica del LM, i un perfil

d'expressió característic de limfoma marginal, suggerint que el punt de trencament de la ciclina D1 (*CCND1*) en aquests pacients podria ser diferent del punt de trencament del LM. Destacar que ambdós casos amb la *t(11;14)(q13;q32)* presentaven un curs clínic poc agressiu més característic del LZME que del LM.

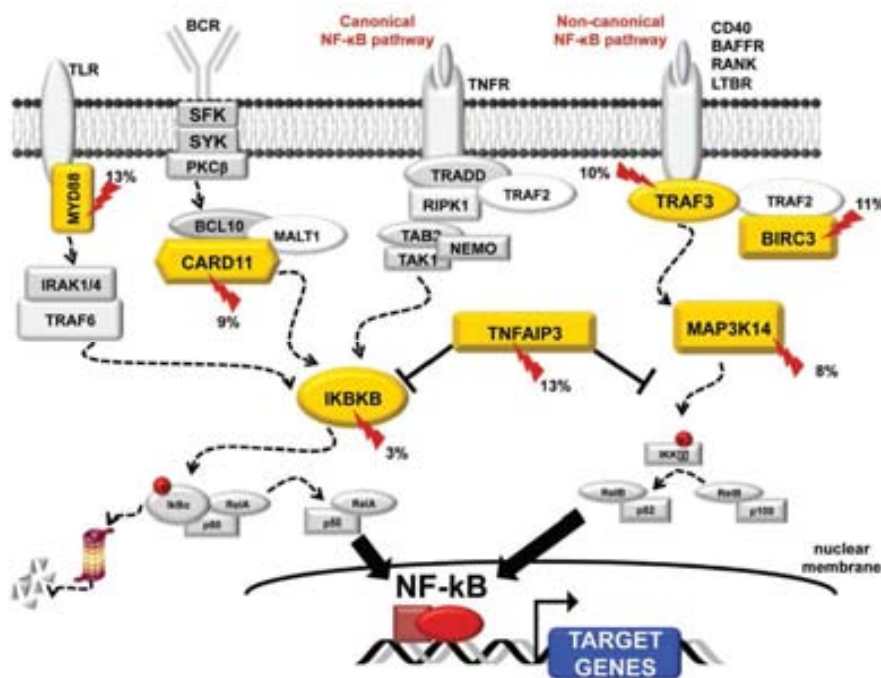


Figura 9. Gens diana per mutacions a la via de NFκB al LZME. (Arcaini i cols., 2012).

L'anàlisi del perfil d'expressió dels microRNAs (miRNA) també ha demostrat un perfil d'expressió diferencial en aquesta patologia. Els miRNAs són RNAs no-codificants que modulen l'expressió de gens a nivell post-transcripcional. La seva desregulació pot tenir un paper essencial en la carcinogènesi (Calin i Croce, 2006). Peveling-Oberhag i cols. (2012) descriuen cinc miRNAs significativament sobreexpressats al LZME, incloent el *miR-21*, *miR-155* i *miR-146a*, així com set miRNAs infraexpressats entre els que destaquen el *miR-139*, *miR-345*, *miR125a* i *miR126*. Els gens d'aquests miRNAs infra i sobreexpressats es troben localitzats a diversos cromosomes, la qual cosa no permet relacionar les alteracions citogenètiques amb la desregulació dels miRNAs. Alguns

d'aquests miRNAs tenen un efecte activador de la via NFκB, freqüentment implicada en la patogènesi del LZME. A més, el paper oncogènic d'alguns d'aquests miRNAs ha estat descrit prèviament en altres neoplàsies hematològiques. Més recentment, Arribas i cols. (2013) descriuen la desregulació de fins a 51 miRNAs al LZME; els més sobreexpressats: *miR-155*, *miR-21*, *miR-34a*, *miR-193b* i *miR-100*, i els miRNAs més infraexpressats: *miR-377*, *miR-27b*, *miR-145*, *miR-376a* i *miR-424*. A més, van observar que miRNAs localitzats a 14q32-31 es trobaven infraexpressats quan es comparaven LZME i teixit limfoide reactiu.

1.3.5. Alteracions moleculars del gen *EZH2*

El gen *EZH2*, localitzat a 7q36.1, codifica per un enzim metiltransferasa d'histones que regula el complex PRC2 (*Polycomb Repressor Complex 2*). PRC2 catalitza la trimetilació de la histona H3K27 silenciament gens diana implicats en processos cel·lulars bàsics com la regulació del cicle cel·lular, la diferenciació cel·lular i el càncer (Sauvageau and Sauvageau, 2010). *EZH2* es troba desregulat en molts tipus de càncer (càncer de mama, pròstata, bufeta, colon, pulmó i tumors pancreàtics) i té un paper crucial en el manteniment de cèl·lules mare i el desenvolupament de tumors. La sobreexpressió d'*EZH2* en aquests tumors es correlaciona amb estadis avançats de la malaltia i mal pronòstic (Chang i cols., 2012). A la medul·la òssia, en condicions normals *EZH2* s'expressa de manera intensa a les cèl·lules pro-B i va disminuint la seva expressió a mida que la cèl·lula avança a estadi pre-B i cèl·lula immadura. Per tant, juga un paper important en la diferenciació primerenca dels limfòcits B (Su i cols., 2003).

S'han descrit mutacions somàtiques a *EZH2* que inactiven el complex PRC2 en LBDCG del centre germinal (14-22%) i en LF (7-22%), però no en LBDCG de fenotip activat (ABC) (Morin i cols., 2010; Ryan i cols., 2011; Lohr i cols., 2012). Als limfomes s'ha descrit que es produeix una mutació *missence* heterozigota que resulta en el canvi de la tirosina Try641 (Y641) per una histidina a l'exó 15, que codifica pel domini catalític SET de *EZH2* (Morin i cols., 2010). Aquesta mutació afecta a l'activitat catalítica d'*EZH2* sobre

la histona H3K27 generant-se una proteïna amb una menor activitat que la proteïna EZH2 intacta (*wt*) per la catalització de la histona H3K27 mono-metilada, però que adquireix més eficiència a les reaccions posteriors (di- i tri-metilació). Al presentar-se la mutació en heterozigosi, ambdós proteïnes *wt* i mutada poden treballar conjuntament augmentant-se així la metilació de la histona H3K27, la qual cosa equivaldria a la sobreexpressió de EZH2 descrita a altres càncers (Chase and Cross, 2011). Recentment s'ha descrit una altre mutació *missence* activadora de *EZH2* que resulta en el canvi del residu A677 per una glicina (A677G) a un pacient amb un LBDCG i a línies cel·lulars de limfomes B (McCabe i cols., 2012).

La inhibició farmacològica de l'activitat de *EZH2* podria fer-se servir en el tractament de pacients diagnosticats de LBDCG o LF no indolent portadors de mutacions a aquest gen. GSK126 es una molècula petita capaç d'inhibir l'activitat metiltransferasa de *EZH2* i que ha demostrat el seu potencial terapèutic en línees cel·lulars i en models murins (McCabe i cols., 2012).

En contrast amb les mutacions en el domini SET d'*EZH2* descrites als limfomes, les mutacions descrites a les neoplàsies mieloides són majoritàriament mutacions sense sentit (*nonsense*) o mutacions que generen un codó *STOP*, i per tant, son deficientes en la seva activitat metiltransferasa d'histones (Nikoloski i cols., 2010; Ernst i cols., 2010; Makishima i cols., 2010). Un 6% de les síndromes mielodisplàsiques (SMD) i altres neoplàsies mieloproliferatives (leucèmia mielomonocítica crònica i pacients amb mielofibrosi) presenten mutacions a *EZH2* però, a diferència dels limfomes, s'ha descrit una elevada prevalença de mutacions en homozigosi (Makishima i cols., 2010). Per altra banda, l'aplicació dels arrays de SNPs a les SMD ha facilitat mapejar regions afectades per disomies uniparentals (UPDs) a 7q i ha permès detectar microdelecions monoal·lèliques d'unes 130 kb a 7q36.1 on es localitza el gen *EZH2* (Nikoloski i cols., 2010). La relació entre les mutacions del gen *EZH2* i la deleció de 7q no està clara (Ernst i cols. 2010, Makishima i cols., 2010; Jerez i cols., 2012), però tan les mutacions patogèniques de *EZH2* com les delecions o les UPDs a 7q36.1 suggereixen que aquest

gen podria actuar com a gen supressor de tumors a les neoplàsies mieloides a diferència dels limfomes. En les SMD els pacients amb mutacions d'*EZH2* presenten un pitjor pronòstic amb una curta supervivència (Nikoloski i cols., 2010; Schlegelberger i cols., 2012).

1.4. TÈCNIQUES CITOGENÈTIQUES I MOLECULARS APLICADES A L'ESTUDI DELS LZME

Seguidament es resumeixen breument les tècniques citogenètiques utilitzades en aquesta tesi.

1.4.1. Citogenètica Convencional (CC)

L'estudi citogenètic ens permet obtenir una informació global de tot el genoma mitjançant l'estudi del cariotip. Durant la divisió cel·lular o mitosi, la cromatina (ADN + proteïnes) es compacta fins a formar elements independents anomenats cromosomes. Aquests arriben al grau màxim de compactació durant la metafase i, per tant, l'estudi citogenètic es realitza sobre els cromosomes en aquesta fase del cicle cel·lular. Un cromosoma en metafase consta de (Figura 10):

- Dues cromàtides germanes, cadascuna de les quals conté un dúplex d'ADN.
- Un centròmer, també anomenat constricció primària, que divideix el cromosoma en dos braços, el braç curt o "p" i el braç llarg o "q". Els centròmers són necessaris per a la migració de les cromàtides germanes cap a pols oposats durant la divisió cel·lular. Segons la posició que ocupa el centròmer en el cromosoma, els cromosomes es classifiquen en:
 - Cromosomes metacèntrics: el centròmer separa dos braços de la mateixa mida.
 - Cromosomes submetacèntrics: el centròmer separa dos braços de diferent grandària, sent el braç "p" sempre més petit que el "q".
 - Cromosomes acrocèntrics: el centròmer es troba en un extrem, quedant un braç "p" molt curt, de vegades gairebé irreconeixible.
- Dos telòmers, o extrems del cromosoma. Els telòmers garanteixen la independència i integritat de cada cromosoma.

Podem diferenciar els cromosomes per la seva mida, la posició del centròmer i la tinció de bandes. Els colorants utilitzats per la tinció dels cromosomes tenen una afinitat especial per tenyir determinades regions cromosòmiques en funció de la proporció de

Adenina (A)- Timina (T) i Citosina (C)- Guanina (G). Per aquest motiu els cromosomes apareixen bandejats un cop tenyits. Una banda es defineix com la part d'un cromosoma que pot ser distingida clarament del segment adjacent perquè apareix tenyida més clara o més fosca. El patró de bandes obtingut després d'una tinció específica permet la identificació precisa de cada cromosoma i de les regions particulars dins dels braços de cada cromosoma. Hi ha diferents tipus de bandes, cadascun dels quals proporciona un patró diferent. El més utilitzat és el patró de **bandes G** (tinció amb el colorant Giemsa), que en funció de la resolució dels cromosomes obtinguts permet obtenir de 300 a 850 bandes fosques i clares. Les bandes G clares presenten un alt contingut en G-C, són zones de replicació primerenca i riques en gens (Sumner i cols., 1993). Les bandes fosques presenten un alt contingut en A-T, són zones de replicació tardana i tenen poc contingut de gens. Cada cromosoma presenta un patró continu de bandes que es numeren de manera consecutiva des del centròmer fins als dos extrems dels braços p i q.

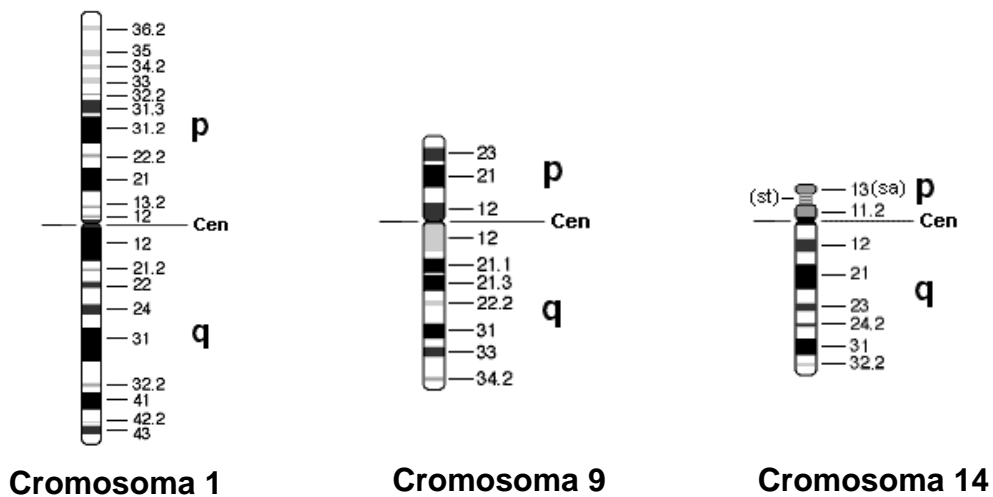


Figura 10. Exemple de ideogrames amb bandes G dels cromosomes 1 (metacèntric), cromosoma 9 (submetacèntric) i cromosoma 14 (acrocentric).

El cariotip humà està format per 23 parells de cromosomes: els autosomes, de l'1 al 22 en ordre decreixent de longitud, i els cromosomes sexuals anomenats X i Y. La

nomenclatura utilitzada per descriure un cariotip normal o patològic s'ha estandarditzat en una nomenclatura acceptada internacionalment, ISCN (*International System for Human Cytogenetics Nomenclature* (ISCN 2005 i ISCN 2009)).

L'estudi del cariotip a les neoplàsies hematològiques ha permès grans avanços en el coneixement de la patogènesi d'aquests tumors, i s'utilitza com a eina diagnòstica i pronòstica (Heim i Mitelman, 2009). En el cas dels limfomes s'estudien les cèl·lules dels teixits implicats: moll d'os, sang perifèrica o gangli limfàtic. Per tal d'aconseguir una major eficiència del cultiu citogenètic, en el cas dels limfomes B amb índex de proliferació baixos, s'afegeix un agent mitogen (acetat de miristat de tetraforbol, TPA entre d'altres) que estimula el creixement de les cèl·lules tumorals i ajuda a detectar amb major freqüència cariotips anòmals.

1.4.2. Hibridació *in situ* fluorescent (FISH)

La tècnica d'hibridació *in situ* fluorescent (FISH) permet detectar i localitzar seqüències específiques d'àcids nucleics (ADN o ARN) sobre preparacions cromosòmiques, extensions cel·lulars i talls de teixit (Pardue i Gall, 1969; Jones, 1970; Harper i Saunders, 1981). La utilització de les tècniques de FISH ha augmentat en els darrers anys com a complement de les tècniques de citogenètica convencional. L'avantatge de la citogenètica convencional rau en la visualització de tots els cromosomes, però presenta diverses limitacions: cal que hi hagi cèl·lules en divisió i en ocasions es poden valorar poques metafases (menys de 20). D'altra banda, els cromosomes poden presentar unes bandes cromosòmiques poc definides sent impossible detectar alteracions cromosòmiques que afectin a regions genètiques molt petites. Per complementar les tècniques citogenètiques convencionals, actualment disposem de les tècniques de FISH (Taula 8).

La tècnica de FISH consisteix en utilitzar petites seqüències d'ADN de cadena senzilla, a les que anomenarem sondes, prèviament marcades directament o indirectament amb molècules fluorescentes (ex: FITC o Rodamina). La base metodològica per a la realització d'aquestes tècniques requereix un procés de desnaturalització de l'ADN tant de la mostra

com de la sonda a utilitzar (que haurà de ser complementària al fragment d'ADN que es desitgi estudiar). Aquest procés es basa en el trencament dels ponts d'hidrogen que uneixen la doble hèlix de l'ADN mitjançant la utilització de temperatures elevades (70-80°C), quedant ADN de cadena senzilla. La desnaturalització de l'ADN també es pot produir per variacions en el pH.

Taula 8. Avantatges i limitacions de la tècnica de CC i FISH.

TÈCNICA	AVANTATGES	LIMITACIONS
CC	Aporta informació de tots els cromosomes	Son necessàries cèl·lules en divisió (metafases) del clon neoplàsic
	Baix cost econòmic	La interpretació de les alteracions depèn de la morfologia cromosòmica Baixa sensibilitat
FISH	Aplicable tant sobre metafases com sobre nucli en interfase Permet l'anàlisi d'un major número de cèl·lules. Major sensibilitat	Aporta informació concreta depenent del tipus de sonda utilitzada

Posteriorment es procedeix a hibridar els ADNs de la mostra i de la sonda incubant-los a una temperatura de 37°C, de manera que es produeixi la unió entre tots dos per complementarietat de bases (procés de renaturalització). La desnaturalització i renaturalització (o hibridació) de l'ADN són, per tant, processos reversibles mitjançant canvis de temperatura. La valoració dels resultats d'hibridació es fa microscòpicament i

tenint en compte el tipus de sonda utilitzada. Les etapes generals de la FISH es detallen a la Figura 11.

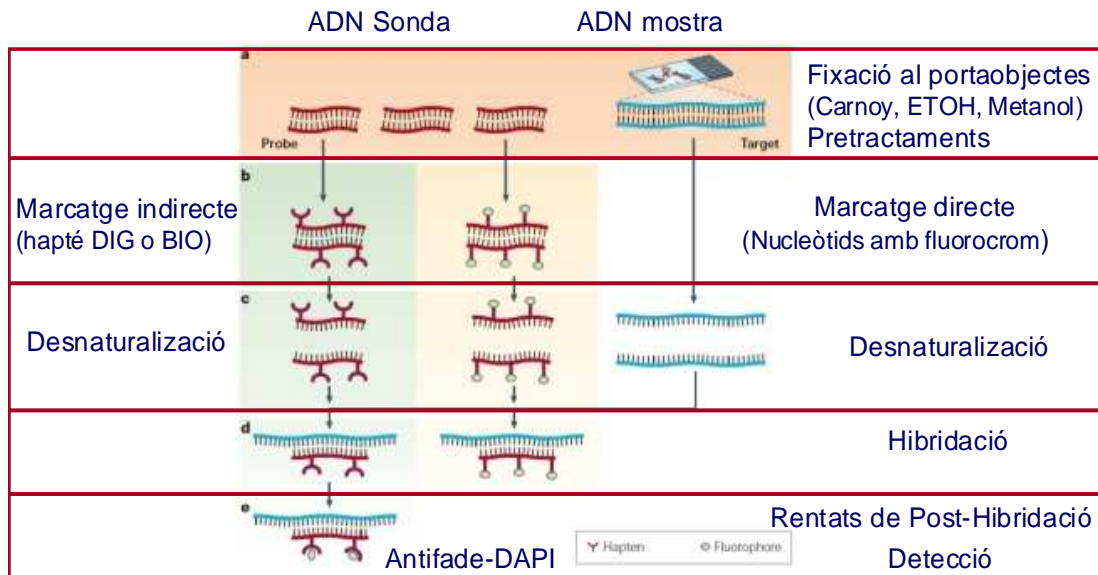


Figura 11. Etapes de la tècnica de FISH.

A principis dels anys 90, es van introduir les tècniques de FISH en el laboratori d'hematologia aplicades al diagnòstic, pronòstic i seguiment de les neoplàsies hematològiques (Chen i cols., 1992; Martin-Subero i cols., 2003).

Sondes aplicades de forma rutinària (FISH convencional) (Figura 10):

- Sondes centromèriques, que hibriden específicament amb seqüències repetides de la regió centromèrica de cada cromosoma. Permeten detectar alteracions cromosòmiques numèriques (aneuploïdies) tant en metafases com en nuclis en interfase (Figura 12b).
- Sondes telomèriques, que hibriden amb seqüències repetides de la regió telomèrica específiques de cada cromosoma (Figura 12c).
- Sondes de pintat cromosòmic, constituïdes per una llibreria de sondes que abasten tot un cromosoma específicament. S'utilitzen per identificar alteracions estructurals o

cromosomes marcadors no ben definits per CC. Per la seva interpretació es requereix l'anàlisi sobre metafases (Figura 12d).

- Sondes de seqüència única (locus específic), marquen regions cromosòmiques concretes o gens. Permeten detectar tant alteracions numèriques com estructurals del locus o gen estudiat tant en metafases com sobre nuclis en interfase (Figura 12a).

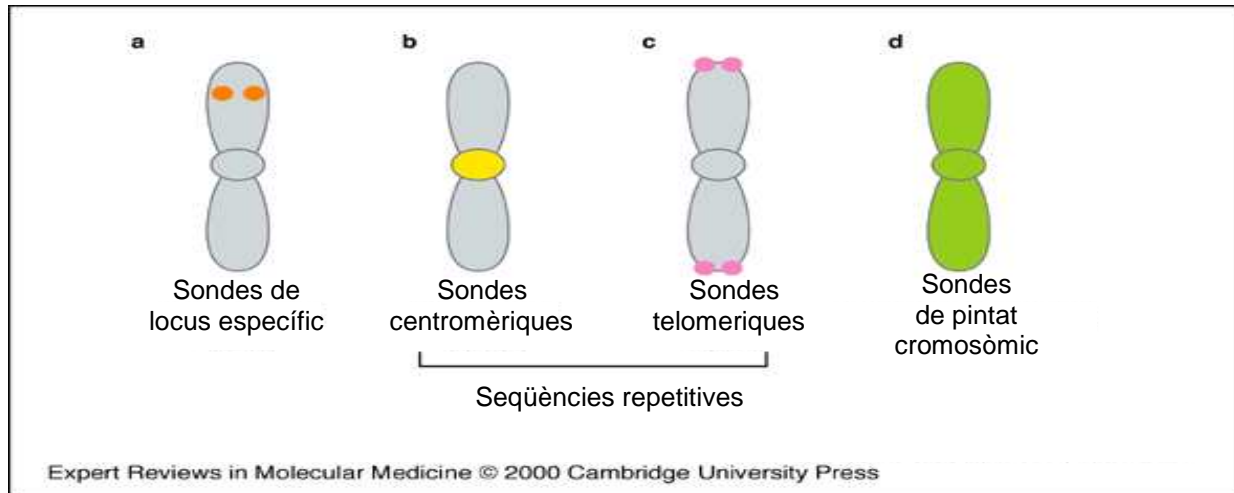


Figura 12. Principals sondes utilitzades en l'estudi de les neoplàsies hematològiques. a) Esquema de la hibridació d'una sonda de locus específic sobre un cromosoma; b) hibridació d'una sonda centromèrica sobre un cromosoma; c) hibridació d'una sonda telomèrica sobre un cromosoma; d) hibridació d'una sonda de pintat cromosòmic sobre un cromosoma. (Esquema adaptat de la revista Expert Reviews in Molecular Medicine).

Dins el grup de sondes de locus específic troben les sondes dissenyades per la detecció de translocacions cromosòmiques:

1. Sondes de doble fusió, marquen els dos gens implicats en una translocació cromosòmica amb fluorocroms diferents. La detecció de dos senyals de fusió permet identificar la presència d'una translocació específica. Aquestes sondes ens donen informació de les dues regions cromosòmiques implicades en una

translocació, i ens permeten detectar patrons de FISH variants (ex: delecions associades a la translocació) (figura 13).

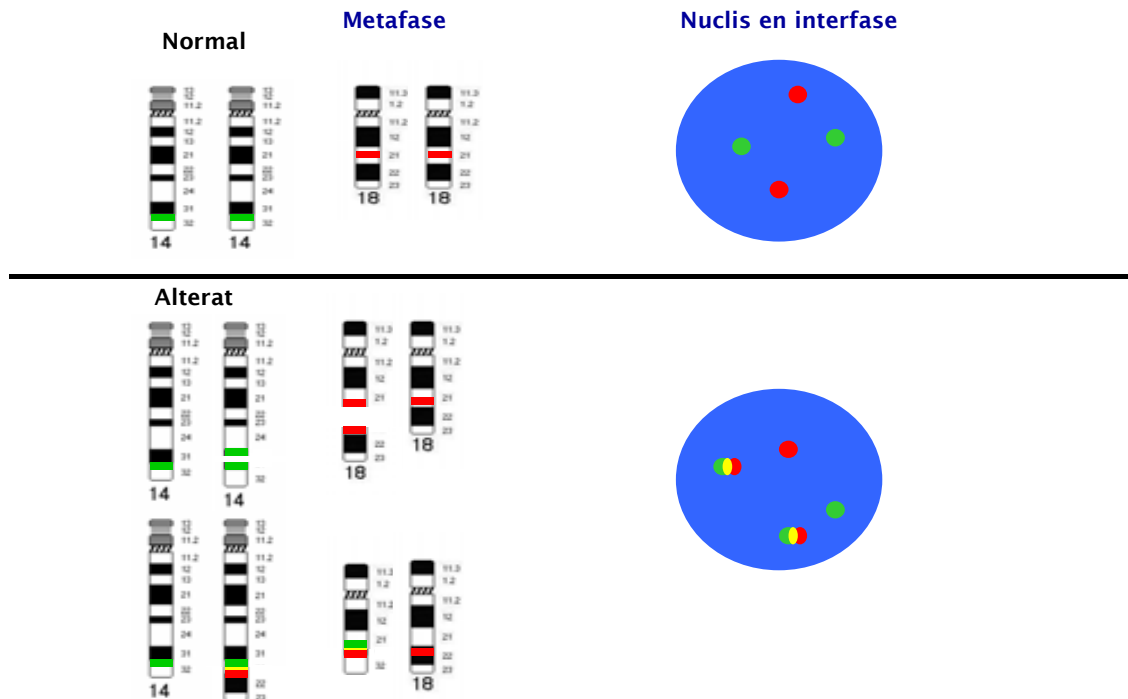


Figura 13. Visualització de la hibridació sobre cromosomes i sobre nuclis en interfase d'una sonda de doble fusió. Dalt s'esquematitza el patró de hibridació normal i sota el patró alterat on s'observen dos senyals de fusió (groc), tant als cromosomes com als nuclis interfàsics. (Esquema extret de la revista *Journal of Molecular Diagnòstics*; Ventura i cols., 2006).

2. Sondes de trencament o *break-apart*, s'utilitzen també per la detecció de translocacions, més freqüentment quan l'oncogen afectat presenta un número de parelles de translocació elevat (Ex: gen *BCL6*). La principal limitació d'aquestes sondes és que no ens donen informació de la parella de translocació. En aquests cas, els extrems a 3' i 5' del punt de trencament de l'oncogen es marquen amb

fluorocroms diferents. La visualització de senyals no fusionades és indicativa de translocació (figura 14).

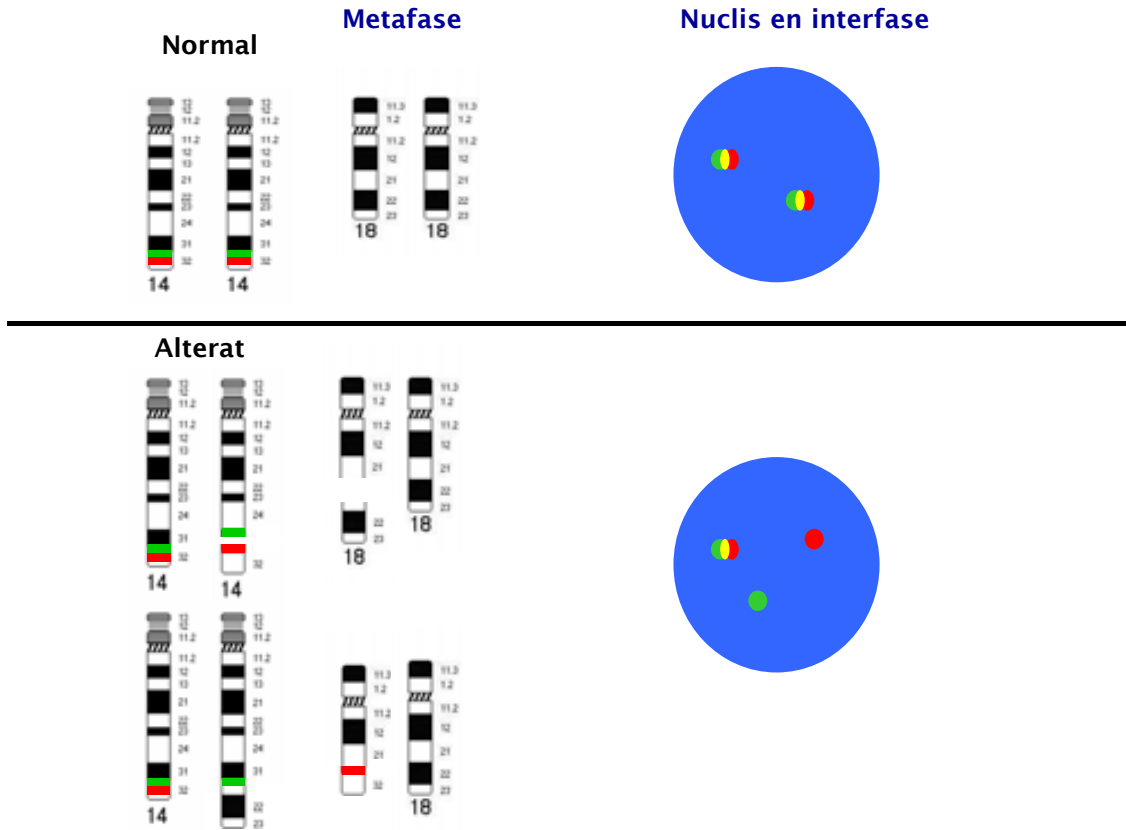


Figura 14. Visualització de la hibridació sobre cromosomes i sobre nuclis en interfase d'una sonda de trencament o *break-apart*. Dalt s'esquemmatitza el patró de hibridació normal i sota el patró alterat on s'observen les dos senyals verda i vermella separades, tant als cromosomes com als nuclis interfàsics. (esquema modificat obtingut de la revista *Journal of Molecular Diagnostics*; Ventura i cols., 2006).

1.4.3. Tècniques de Multicolor-FISH

Actualment s'han desenvolupat tot un conjunt de tècniques de hibridació in situ fluorescent (FISH): tècniques de multicolor-FISH (M-FISH), de *Spectral Karyotyping* (SKY), i de *cross-species colorbanding* FISH (RxFISH) amb la intenció de resoldre algunes carències de la FISH convencional i aportar una major informació al coneixement de les alteracions genètiques a les neoplàsies. Amb l'evolució d'aquestes tècniques, s'ha

augmentat el potencial diagnòstic de la FISH, ja que permeten l'anàlisi de tot el genoma en un únic experiment.

La FISH utilitzant combinacions de múltiples fluorocroms i les seves variants *Spectral Karyotyping* (SKY) i multiplex-FISH (M-FISH) fan servir un conjunt de sondes de pintat cromosòmic, marcades amb cinc fluorocroms que permeten la classificació dels 24 cromosomes humans amb colors diferents (Schrock i cols., 1996; Speicher i cols., 1996).

La M-FISH utilitza un software que permet la detecció i la discriminació de 27 sondes diferents que hibriden al mateix temps. L'SKY en canvi, escaneja les imatges després de la hibridació i utilitza per identificar els cromosomes hibridats la visualització de l'espectre predefinit per cada cromosoma.

La tècnica de *cross-species color banding* o RxFISH, a diferència del M-FISH o l'SKY, es basa en la creació de sondes de pintat cromosòmic específiques pels diferents cromosomes humans a partir d'una barreja d'ADNs de diferents espècies de gibó. L'ADN utilitzat com a sonda s'obté a partir de cromosomes de diferents espècies de gibó (*Hylobates concolor* i *Hylobates syndactylus*) mitjançant *flow-sorted*. Aquest ADN s'amplifica utilitzant una reacció de PCR i es marca combinadament amb tres fluorocroms diferents (Cy3, Cy5 i FITC) (Müller i cols., 1997).

L'ADN d'aquestes espècies de gibó s'ha trobat que presenta un elevat grau d'homologia amb el de l'espècie humana (98%). A més, el procés evolutiu en aquestes espècies resulta en un elevat número de reordenaments que ens permet obtenir un patró de bandes únic per cada cromosoma humà. Utilitzant aquestes dues característiques, es va pensar en fer servir aquests ADNs d'espècies de gibó marcats amb fluorescència per obtenir un patró de bandes específic de cada cromosoma humà i utilitzar-los així com a sonda per aplicar sobre metafases humanes i detectar reordenaments intracromosòmics. Es per tant, una tècnica que combina el bandeig cromosòmic amb la classificació per colors a diferència d'altres tècniques de multicolor FISH.

Amb el marcatge combinatori dels diferents cromosomes de gibó amplificats utilitzant tres fluorocroms (Cy3, Cy5 i FITC), s'obté un patró de bandes on s'observen set colors

diferent. En total, a una metafase humana normal, s'obtenen 118 bandes. Entre aquestes s'inclouen petites àrees on no hi ha hibridació. Aquestes àrees de no-hibridació es visualitzen com a un vuitè color (DAPI) que també actua com a banda cromosòmica. Com a resultat, s'obté un únic patró de bandes cromosòmiques que ens permet una fàcil classificació cromosòmica.

1.4.4. Tècnica de seqüenciació directa o mètode Sanger

Frederick Sanger va desenvolupar a la dècada de 1970 la tècnica que va permetre seqüenciar ADN a gran escala. La tècnica de seqüenciació de *Sanger* fa servir didesoxinucleòtids (nucleòtids modificats sense grup hidroxil a l'extrem 3') que provoquen que s'aturi el procés de síntesi de ADN quan s'incorporen a la cadena que s'està sintetitzant. Això es degut a que la polimerasa necessita un grup hidroxil a la posició 3' per poder agregar el següent nucleòtid. L'ADN es sintetitza *in vitro* fent servir un motlle de la cadena de ADN que es vol seqüenciar, didesoxinucleòtids (ddNTP), un excés de desoxinucleòtids, un cebador o *primer* i un enzim, la polimerasa.

Una de les variacions de la tècnica *Sanger* és afegir ddNTP marcats amb una molècula fluorescent, la qual cosa millora el rendiment de la seqüenciació. Cada un dels quatre ddNTPs es marca amb un fluorocrom que emet a una longitud d'ona diferent. S'han de realitzar 4 reaccions per separat, després es barregen els tubs i es fan migrar per electroforesi per poder realitzar la lectura de les seqüències. El procés està detallat a la figura 15.

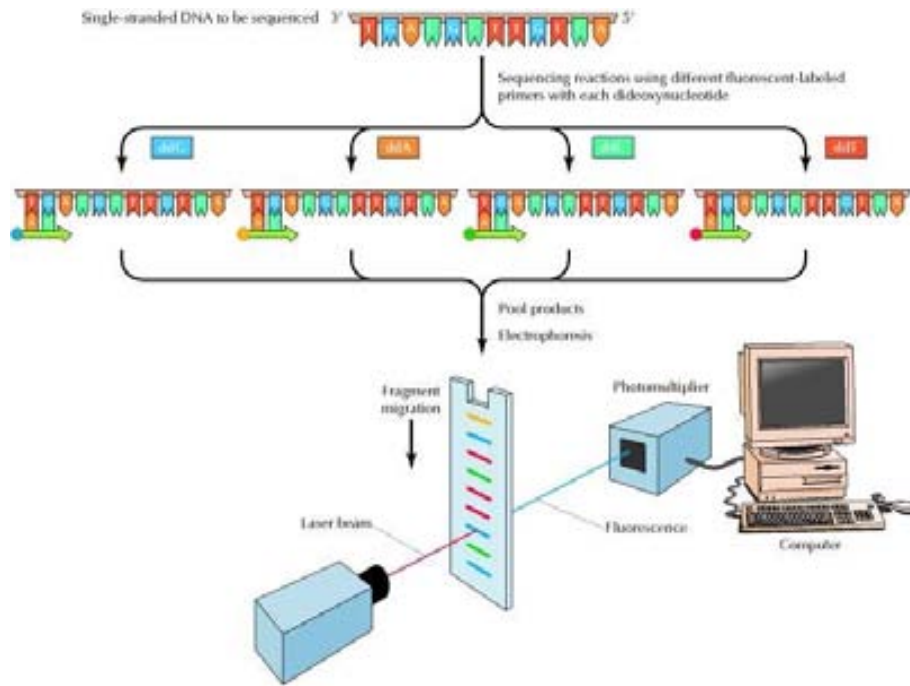


Figura 15. Sequenciació automàtica del ADN. (esquema obtingut de The Cell a Molecular approach, 2^oEd. Geoffrey Cooper).

2. HIPÒTESI I OBJECTIUS

2.1. HIPÓTESI

El LZME és un tipus de limfoma no-Hodgkin poc freqüent i recentment descrit per la classificació de la OMS 2008 com una entitat diagnòstica independent i que presenta una elevada heterogeneïtat clínic-biològica. Per aquestes raons, encara no es coneixen marcadors genètics específics d'aquesta malaltia.

Les tècniques de citogenètica i FISH amb sondes de locus específic han permès detectar alteracions citogenètiques recurrents a altres tipus de limfomes i neoplàsies hematològiques i representen una eina útil per l'estudi de les alteracions del genoma complet.

La elevada heterogeneïtat tant clínic com biològica dels LZME requereix de l'anàlisi d'un número elevat de pacients per tal de definir el perfil genètic d'aquesta entitat. La troballa d'alteracions citogenètiques recurrents al LZME representarà un avenç en el coneixement dels mecanismes patogènics implicats als limfomes B i ens permetrà definir marcadors de diagnòstic i progressió de la malaltia.

2.2. OBJECTIUS

Caracteritzar les alteracions citogenètiques i moleculars de pacients diagnosticats de LZME i analitzar la relació de les troballes amb les característiques clíniques, biològiques i evolutives dels pacients.

Objectius específics

1. Recollir dades clínic-biològiques a nivell europeu d'una sèrie llarga de pacients diagnosticats de LZME seleccionats pel Grup de Limfomes Esplènics (SLBG).
2. Analitzar mitjançant citogenètica convencional i FISH les alteracions cromosòmiques més freqüents al LZME per tal de definir el perfil d'alteracions citogenètiques d'aquesta entitat.
3. Correlacionar les alteracions citogenètiques amb altres característiques de la malaltia, tals com les dades clíniques i de laboratori, el immunofenotip i l'estat mutacional del gen *IGVH*.
4. Definir el valor pronòstic de les troballes citogenètiques i d'altres paràmetres clínic-biològics.
5. Estudi del gen *EZH2* en pacients amb alteracions citogenètiques del braç llarg del cromosoma 7.

3. RESULTATS

3.1. Article 1

Alteracions citogenètiques i el seu valor pronòstic a una sèrie de 330 pacients amb un limfoma de la zona marginal esplènica: estudi multicèntric del grup de limfomes de cèl·lula B esplènics. Blood. 2010;116(9):1479-88.

Es va realitzar un estudi retrospectiu col·laboratiu per caracteritzar citogenèticament el limfoma de la zona marginal esplènica (LZME) i determinar el valor pronòstic de les alteracions cromosòmiques. De 330 casos, el 72% presentava un cariotip alterat, el 53% eren complexes, i el 29% tenia una única alteració cromosòmica. Les alteracions predominants van ser els guanys de 3/3q i 12q, les pèrdues de 7q i 6q i translocacions que involucren 8q, 1q i 14q. Es va detectar expressió de CD5 en 39 de 158 casos (25%). Les alteracions citogenètiques del grup CD5+ difereixen significativament de les del grup CD5-. Els casos amb *IGHV* no mutat es van associar significativament amb les delecions de 7q i *TP53* (detectades per FISH). Es va observar una forta associació entre l'ús de la família *IGVH1-2* i les delecions de 7q, alteracions de 14q i cariotip alterat. A l'anàlisi univariat, els pacients amb dos o més alteracions, afectació de 14q i pèrdues de *TP53* presentaven una supervivència més curta; mentre que la pèrdua de 7q no va afectar la supervivència. En l'anàlisi multivariat, les alteracions citogenètiques no van mantenir el seu significat pronòstic. Els paràmetres que van afectar negativament a la supervivència van ser l'hemoglobina i l'edat. En conclusió, el perfil citogenètic dels LZME és diferent del perfil d'altres limfomes de cèl·lules B. La complexitat de la cariotip, les alteracions de 14q, i les pèrdues del gen *TP53* són indicadors de mal pronòstic i poden ser considerats, juntament amb altres paràmetres clínico-biològics per determinar el pronòstic del LZME.

Cytogenetic aberrations and their prognostic value in a series of 330 splenic marginal zone B-cell lymphomas: a multicenter study of the Splenic B-Cell Lymphoma Group

Marta Salido,^{1,2} Cristina Baró,^{1,2} David Oscier,³ Kostas Stamatopoulos,⁴ Judith Dierlamm,⁵ Estela Matutes,⁶ Alexandra Traverse-Glehen,⁷ Françoise Berger,⁷ Pascale Felman,⁷ Catherine Thieblemont,⁸ Stefan Gesk,⁹ Anastasia Athanasiadou,⁴ Zadie Davis,³ Anne Gardiner,³ Fuensanta Milla,¹⁰ Ana Ferrer,¹ Manuela Mollejo,¹¹ María José Calasanz,¹² Lourdes Florensa,¹ Blanca Espinet,¹ Elisa Luño,¹³ Iwona Wlodarska,¹⁴ Gregor Verhoef,¹⁵ Marta García-Granero,¹² Antonio Salar,¹⁶ Theodora Papadaki,¹⁷ Sergio Serrano,¹ Miguel A. Piris,¹⁸ and Francesc Solé¹

¹Laboratori de Citogenètica Molecular, Laboratori de Citologia Hematològica, Servei de Patologia, Hospital del Mar, Parc de Salut Mar, Grup de Recerca traslacional en neoplàsies hematològiques, and Escola de Citologia Hematològica Soledad Woessner-IMAS, Barcelona, Spain; ²Department Biologia Animal, Vegetal i Ecologia, Unitat d'Antropologia Biològica, Facultat de Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain; ³Molecular Biology Department, Royal Bournemouth Hospital, Bournemouth, United Kingdom; ⁴Hematology Department and HCT Unit, George Papanicolaou Hospital, Thessaloniki, Greece; ⁵Department of Oncology and Haematology, Medical Centre, University Hospital Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany; ⁶Section of Haemato-Oncology, Institute of Cancer Research, London, United Kingdom; ⁷Hospices Civils de Lyon, Centre Hospitalier Lyon Sud Service d'Anatomie Pathologique, Pierre-Bénite, France; ⁸Université Lyon 1, Equipe d'Accueil 3737, Faculté Lyon-Sud, Lyon, France; ⁹Service d'Hémo-oncologie, Hôpital Saint-Louis, Université Paris, Paris, France; ¹⁰Institute of Human Genetics, University Hospital Schleswig-Holstein, Kiel, Germany; ¹¹Servei d'Hematologia, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain; ¹²Servicio de Anatomía Patológica, Complejo Hospitalario de Toledo, Toledo, Spain; ¹³Departamento de Genética, Facultad de Ciencias, Universidad de Navarra, Pamplona, Spain; ¹⁴Servicio de Hematología, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, Spain; ¹⁵Department of Haematology, University Hospital Gasthuisberg, Leuven, Belgium; ¹⁶Center for Human Genetics, Catholic University Leuven, Leuven, Belgium; ¹⁷Servei d'Hematologia Clínica, Hospital del Mar, Parc de Salut Mar, Barcelona, Spain; ¹⁸Department of Pathology, Evangelismos Hospital, Athens, Greece; and ¹⁹Molecular Pathology Programme, Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, Madrid, Spain

We conducted a retrospective collaborative study to cytogenetically characterize splenic marginal zone lymphoma (SMZL) and ascertain the prognostic value of chromosomal aberrations. Of 330 cases, 72% displayed an aberrant karyotype, 53% were complex, and 29% had a single aberration. The predominant aberrations were gains of 3/3q and 12q, deletions of 7q and 6q and translocations involving 8q/1q/14q. CD5 expression was detected in 39 of 158 cases (25%). The cytogenetic

makeup of the CD5⁺ group differed significantly from that of the CD5⁻ group. Cases with unmutated *IGHV* were significantly associated with deletions of 7q and *TP53*. A strong association was noted between usage of the *IGHV1-2* and deletion 7q, 14q alterations, and abnormal karyotype. On univariate analysis, patients with more than or equal to 2 aberrations, 14q alterations, and *TP53* deletions had the shortest survival; 7q deletion did not affect survival. On multivariate analysis, cyto-

netic aberrations did not retain prognostic significance; the parameters negatively affecting survival were hemoglobin and age. In conclusion, the cytogenetic profile of SMZL is distinct from other B-cell lymphomas. Complexity of the karyotype, 14q aberrations, and *TP53* deletions are poor prognostic indicators and may be considered together with other clinicobiologic parameters to ascertain the prognosis of SMZL. (*Blood*. 2010; 116(9):1479-1488)

Introduction

Splenic marginal zone lymphoma (SMZL) is a rare low-grade B-cell lymphoma considered as a distinct entity in the World Health Organization (WHO) classification.^{1,2} The diagnosis may be problematic in cases without spleen histology. For this reason, recently, the Splenic Lymphoma Group (SBLG) proposed guidelines for the diagnosis of SMZL and outlined the main clinical, cytogenetic, and biologic features of the disease.³⁻⁵

Cytogenetic data have been reported in several series of SMZL, mainly including patients with active disease that required splenectomy.⁶⁻¹² Approximately 70% to 80% of cases have been reported to exhibit cytogenetic and/or molecular genetic abnormalities, however, without a disease-specific cytogenetic alteration.³ The most frequent cytogenetic abnormalities are deletions at the

7q22-q32 band, followed by gains of chromosome 3/3q. Complex karyotypes are common: the chromosomes most frequently involved are 1, 3, 7, 8, and 14.

The true incidence of cytogenetic abnormalities in SMZL has not been well established. Furthermore, it is still uncertain whether cytogenetic abnormalities have a prognostic impact in SMZL, as is the case for chronic lymphocytic leukemia (CLL). Deletions of chromosomes 7q or 17p have been proposed as adverse prognostic indicators; however, the true prognostic impact of such abnormalities is difficult to assess, given the small size of the respective cohorts.¹³⁻¹⁵

In the present study, we describe in detail the cytogenetic findings in a large group of well-characterized SMZLs collected by

Submitted February 1, 2010; accepted May 9, 2010. Prepublished online as *Blood* First Edition paper, May 17, 2010; DOI 10.1182/blood-2010-02-267476.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 USC section 1734.

The online version of this article contains a data supplement.

© 2010 by The American Society of Hematology

the SBLG to ascertain: (1) the true cytogenetic profile of SMZL, (2) possible correlations between cytogenetic abnormalities and other disease features, and (3) prognostic implications of cytogenetic findings.

Methods

Patients

A total of 330 patients with a diagnosis of SMZL were included in the study. Cases were referred from the French (E. Callet-Bauchu, C.T., and A.T.-G.), British (D.O. and E.M.), German (R. Siebert and J.D.), Belgian (G.V. and I.W.), and Greek (K.S., A.A., and T.P.) groups and the Spanish Cooperative Group for Hematological Cytogenetics (GCECGH).

For splenectomized cases ($n = 143$), the diagnosis was established according to the 2008 WHO classification criteria.^{1,2} For nonsplenectomized cases ($n = 187$), the diagnosis of SMZL was established according to SBLG guidelines,³ based on a combination of features, including clinical presentation, lymphocyte morphology, immunophenotype, and bone marrow (BM) histology because of the limited number of cases with splenic histology for review ($n = 143$). The phenotype in patients without available spleen histology was suggestive of SMZL. In particular, it revealed the presence of a clonal B-cell population with low CLL scores, negative for either CD103 or (in all tested cases) CD123; a proportion of cases were CD11c⁺ and a few weakly expressed CD25; on these grounds, a diagnosis of hairy cell leukemia was excluded.

Table 1 summarizes the main clinical and hematologic features as well as follow-up data for all patients with available information (supplemental Figure 1, available on the *Blood* Web site; see the Supplemental Materials link at the top of the online article). Progression was defined as: requirement to treatment because of development or progression of lymphadenopathy, systemic symptoms, or histologic transformation into large B-cell lymphoma.

The study was approved by the local Ethics Review Committee of each Institution, in accordance with the guidelines of the Declaration of Helsinki.

Some cytogenetic, molecular, and clinical information has been reported previously.^{6-8,10-12}

Cytogenetic and FISH studies

Cytogenetic studies were performed in all patients at diagnosis before any treatment or at the time of splenectomy. Chromosome analysis was carried out on lymphoid cells from peripheral blood ($n = 222$), bone marrow ($n = 36$), lymph nodes ($n = 6$), or spleen ($n = 66$), as previously described.¹⁰ Cytogenetic analysis with G- and/or R-banding was performed locally, whereas reports were reviewed centrally by the main investigators (C.B., M.S., and F.S.). Karyotypes were described according to the International System for Human Cytogenetic Nomenclature.¹⁶

The following definitions were adopted: (1) complex karyotype: any karyotype presenting 3 or more cytogenetic aberrations or the existence of 2 or more clones; and (2) "2-aberration" group: patients exhibiting 2 aberrations in the same karyotype or 2 karyotypically independent clones with a single change. Single aberrations may include numerical or structural changes; the latter category encompasses derivative chromosomes and translocations.

Fluorescence in situ hybridization (FISH) was performed locally in cases with available fixed cells previously processed for G-banding analysis, as described.¹⁰ The DNA probes used for FISH analyses are listed in supplemental Table 1. The following cut-offs were used for chromosome gain, loss, or rearrangement: 5%, 10%, or 5%, respectively.

Cross-species color banding or spectral karyotyping techniques were applied in some cases with a complex karyotype to accurately define the chromosomal aberrations; results from this analysis have been reported previously.^{10,17} Based on multicolor FISH findings, the chromosomal aberrations of these cases were redefined and compiled with the G-banding karyotype data.

Table 1. Clinical features of 171 SMZL patients with available survival data

Feature	n (%)
Median age, y (range)	67 (32-88)
Sex, male/female	81/90
ECOG ≥ 2	5 (7.1)
Splenomegaly	112/138 (81.2)
Bone marrow involvement	76/81 (93.8)
Lymphocytosis $\geq 5 \times 10^9/L$	62/137 (45.3)
Villous lymphocytes	34/52 (65.4)
LDH ≥ 450 mg/L	28/91 (30.8)
β_2 -Microglobulin ≥ 3 mg/L	48/81 (59.3)
Albumin ≤ 35 g/L	17/74 (23)
Hb < 12 g/dL	75/143 (52.4)
Platelet count $\leq 100 \times 10^9/L$	31/143 (21.7)
M component	16/41 (39)
HCV infection	4/48 (8.3)
Autoimmune phenomena	5/36 (13.8)
CD5 expression*	26/115 (22.6)
IG gene rearrangements	
Unmutated†	41/100 (41)
Mutated†	59/100 (59)
IGHV1-2	32/100 (32)
Follow-up data	
Deaths	69/171 (40.3)
Median overall survival, y (range)	10.6 (0.4-18.8)
Median follow-up, y (range)	5 (2 mo-25.3)
III score	
Low risk	23/65 (35.4)
Intermediate risk	20/65 (30.8)
High risk	22/65 (33.8)
Treatment	
No therapy	28/159 (17.6)
Splenectomy	85/159 (53.5)
Chemotherapy	23/159 (14.5)
Splenectomy + chemotherapy	23/159 (14.5)
CR after therapy	22/134 (16.4)
PR after therapy	35/134 (26.1)
Stable disease	11/134 (8.2)
Progression after initial therapy	60/134 (44.8)
Nonresponse	6/134 (4.5)

ECOG indicates Eastern Cooperative Oncology Group; HCV, hepatitis C virus; and III, Intergruppo Italiano Linfomi.

*CD5 expression in PB lymphocytes by flow cytometry.

†After the 98% cut-off value for identity to germline.

Statistical analysis

The following parameters were analyzed for possible associations with survival: gender, age, performance status, hemoglobin (Hb) level, platelet count, leukocyte and lymphocyte count, serum albumin, serum lactate dehydrogenase (LDH), and β_2 -microglobulin levels, CD5 expression, splenectomy, and chemotherapy treatment. Regarding cytogenetic and molecular data, the variables analyzed were: complexity of the karyotype (normal karyotype vs sole anomaly vs 2 alterations vs 3 or more alterations), 7q deletions, 14q involvement, 14q32 translocations, 14q deletions, trisomy 18, 6q deletions, gain of chromosome 3/3q by conventional cytogenetics and FISH, and *TP53* status by FISH and *IGHV* mutational status.

Statistical associations were assessed using Pearson's χ^2 test and Fisher exact test, depending on sample size. The actuarial survival analysis was performed according to the Kaplan-Meier method, and log-rank test was used for comparison of survival curves between different groups of patients. For each patient, overall survival (OS) was calculated from the date of diagnosis to death (from any cause) or last follow-up. Patients still alive were censored at the last known date of contact. A total of 95% confidence limits for OS were computed using the Kalbfleisch and Prentice method.

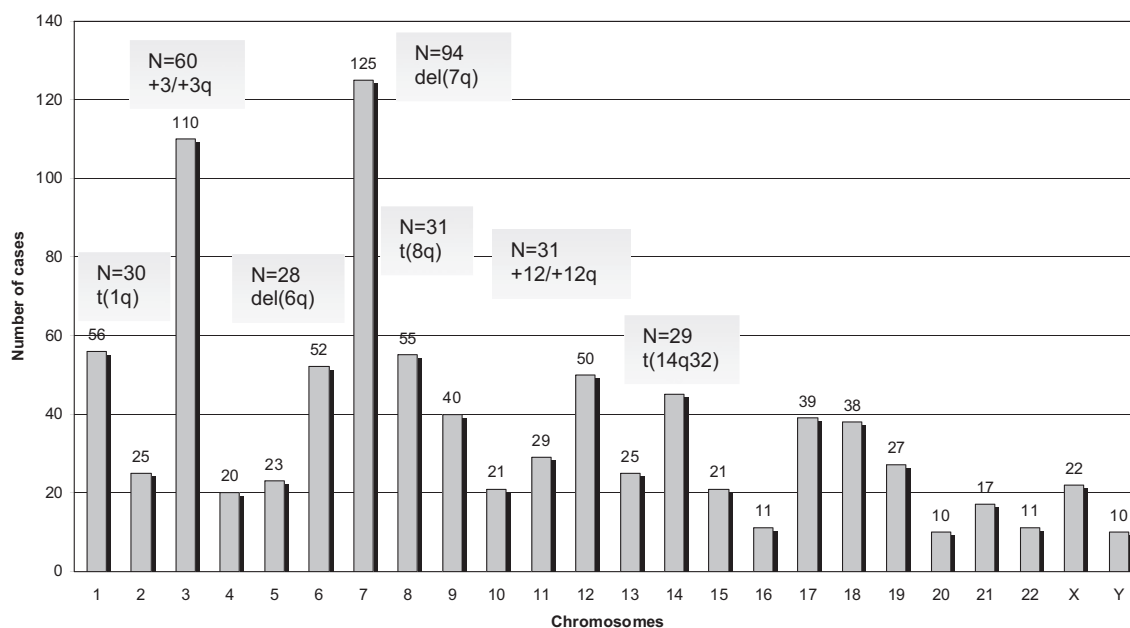


Figure 1. The frequency of chromosomes involved in SMZL patients.

For multivariate analyses, only cases with complete data were included (n = 140). Parameters that were statistically significant in the univariate analyses were included in the multivariate regression procedure. Multivariate analysis was performed using the Cox regression method. All statistical analyses were performed with SPSS, version 15 (SPSS).

Results

Cytogenetic and FISH analyses

Numerical and structural aberrations. Among 330 SMZL cases analyzed by G- or R-banding cytogenetics, 239 (72%) displayed an aberrant karyotype. Within this subgroup, 68 cases (29%) showed a single cytogenetic aberration (supplemental Table 2); an additional 44 of 239 cases (18%) carried 2 alterations, whereas 127 of 239 cases (53%) showed a complex karyotype (3 or more cytogenetic abnormalities). Cytogenetic results are summarized in Figure 1 and Tables 2 to 4.

A total of 882 alterations were identified, of which 216 were numerical, whereas the remaining 666 were structural. The mean number of alterations per case was 2.7 (range, 1-25): (1) numerical: 0.6 (range, 0-11); and (2) structural: 2.1 (range, 0-19). Chromosomes most frequently involved (in order of frequency) were: 7, 3, 1, 8, 6, 12, and 14. Chromosomal gains (n = 125) were more frequent than losses (n = 86). The most common numerical aberrations were gain of material from chromosome 3/3q (60 of 239 cases with aberrant karyotype, 25%), trisomy 18 (25 of 239 cases, 10%), and trisomy 12 (18 of 239 cases, 8%).

The most frequent chromosomal regions affected by structural abnormalities were 7q (109 cases), 3q (42 cases), 14q (40 cases), 6q (37 cases), 1q (30 cases), and 8q (29 cases; Figure 2); the predominant structural aberration was deletion 7q (94 of 239; 39%). Deletion breakpoints at 7q were heterogeneous, being q21 the most proximal and q36 the most terminal breakpoint. In order of frequency, 7q22 (35 cases) was the most recurrent breakpoint followed by 7q32 (22 cases), 7q31 (16 cases), 7q21 (7 cases), 7q34 (6 cases), and 7q33 (3 cases). In 6 cases, this information was not available. Seventeen of 94 (18%) cases had concomitant deletion 7q and gain of 3q in the same karyotype.

Translocations involving the immunoglobulin gene loci. A total of 29 of 239 cases with aberrant karyotype (12%) carried a translocation involving the chromosome 14q32 region (*IGH* gene locus), in 2 cases as a single anomaly [both with t(6;14)(p21;q32)]. In 13 of 29 cases with a rearranged chromosome 14q32, the partner chromosome could not be defined (supplemental Table 3). Among the remaining cases, the following chromosomal aberrations were identified: t(14;19)(q32;q13) (4 cases), t(6;14)(p21;q32) (3 cases), t(9;14)(p13;q32) (4 cases), and t(1;14)(q21;q32) (2 cases); translocations t(1;14)(p34;q32), t(1;14)(p22;q32), t(9;14)(p11.3;q32), t(11;14)(q21;q32), and t(12;14)(q23;q32) and duplication dup(14)(q32.1q32.3) were detected in 1 case each. Three of 4 patients with t(14;19) had additional 14q32 alterations. Translocations t(11;14)(q13;q32), t(14;18)(q32;q21), and t(3;14)(q27;q32)

Table 2. Summary of the cytogenetic data of 330 SMZL cases included in the present study

Cytogenetic finding	SMZL patients, no. (%; n = 330)
Abnormal/normal	239/91 (72)
Single alteration	68/239 (29)
2 alterations	44/239 (18)
3 alterations or more	127/239 (53)
+3	38 cases
+3q	26 cases
Gain 3/3q	60/239 (25)
+3/+3q as a sole alteration	1/60 (2)
Alteration more frequently associated with +3	
+18	12/38 (32)
+12	8/38 (21)
del(7q)	94/239 (39)
del(7q) as a single alteration	22/94 (23)
Structural alterations at 7q	26/239 (11)
concurrent del(7q) and t(7q)	8/94 (9)
+3/+3q and del(7q)	17/94 (18)
t(14q32)	29/239 (12)
del(6q)	28/239 (11.7)
del(13q)	12/239 (5)
t(8q24)	5/239 (2)
+12	18/239 (8)
+18	25/239 (10)

Table 3. Incidence of individual chromosome abnormalities appearing as single aberrations or associated with other aberrations

Anomaly	Total n (% of all cases)	Isolated, n (%)	Plus a single additional abnormality, n (%)	As part of complex abnormalities, n (%)
7q-	94 (39)	22 (23)	16 (17)	54 (57)
+3/+3q	60 (25)	4 (7)	10 (17)	46 (77)
+1q	15 (6)	0	2 (13)	13 (87)
1p-	11 (5)	0	2 (18)	9 (82)
8p-	9 (4)	0	0	9 (100)
8q+	4 (2)	0	0	4 (100)
t(8q)	21 (9)	1 (5)	0	20 (95)
6q-	24 (10)	2 (8)	5 (21)	17 (71)
+12/12q+	30 (13)	5 (17)	5 (17)	20 (66)
t(14q32)	29 (12)	2 (7)	5 (17)	22 (76)
14q-	8 (3)	1 (12.5)	3 (37.5)	4 (50)

as well as translocations typical of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphomas were not detected.

All cases with t(9;14)(p13;q32) were CD5⁻. Spleen histology information was available in 3 cases: interestingly, 2 of 3 showed a diffuse pattern of infiltration. Finally, FISH analysis was performed in 3 of 4 cases with t(9;14)(p13;q32) and confirmed the involvement of the *PAX5* gene.

Translocations involving the immunoglobulin kappa (*IGK*) or lambda (*IGL*) light chain gene loci at chromosomes 2p and 22q, respectively, were detected in 6 cases, as follows: t(2;7)(p11-12;q22) (5 cases; 1 confirmed by FISH, also involving the *CDK6* gene) and t(8;22)(q24;q11) (1 case).

Comparison of classic karyotype and FISH results. A comparison of classic karyotype and FISH results is given in supplemental Table 4. Notably, no differences were observed with regard to the frequency of detection of either trisomy 3/3q or *IGH* translocations by conventional cytogenetic or FISH analysis. In contrast, a higher proportion of cases with deletion 17p was detected by FISH versus conventional karyotype (18% vs 8.7%, respectively). Among cases with 11q deletion (n = 16), FISH

analysis did not provide evidence of involvement of the *ATM* gene. Regarding deletions 7q or 13q as well as trisomy 12, only a few cases were analyzed by FISH using relevant probes, thus precluding any meaningful comparisons with the results from classic cytogenetic analysis.

Cytogenetic profiling of CD5⁺ cases

Among 158 cases with available data, 39 (25%) were CD5⁺. Table 4 compares clinical features and cytogenetic findings in CD5⁺ and CD5⁻ cases. The CD5⁺ subgroup did not differ from the CD5⁻ subgroup with regard to age, gender, β_2 -microglobulin and LDH levels, hematologic values, the presence of villous lymphocytes, and *IGHV* gene mutational status.

Interestingly, however, despite the relative homogeneity of the 2 groups defined by CD5 expression, their cytogenetic makeup differed. In particular, trisomy 3/3q, deletion 6q, and trisomy 18 were significantly more frequent in the CD5⁺ group ($P = .045$, $P = .004$, and $P = .038$, respectively), whereas a single abnormality was more common in the CD5⁻ group ($P = .040$). Complex

Table 4. Comparison of clinical and cytogenetic data in CD5⁻ versus CD5⁺ SMZL cases

Characteristic	CD5 ⁻ , N (median or %)	CD5 ⁺ , N (median or %)	P
Age, y, ≥ 65 y	(68)	(67)	.898
Sex, male/female	0.85	1.05	.712
Hemoglobin, g/dL, ≤ 12 g/dL	(11)	(11)	.959
β_2 -Microglobulin, > 3 mg/L	31/50 (62%)	16/24 (66.6%)	.696
LDH, > 450 mg/L	15/62 (24%)	10/24 (41%)	.109
WBCs, $\times 10^9/L$, $\geq 10 \times 10^9/L$	100 (12 300)	32 (13 165)	.316
Lymphocytes, $\times 10^9/L$, $\geq 5 \times 10^9/L$	95 (5300)	33 (6900)	.454
Villous lymphocytes	27/37 (73%)	12/18 (66.6%)	.629
<i>IGHV</i> mutated	30/50 (60%)	9/14 (64%)	.771
Median survival time, y	9.4	10.6	.898
Cytogenetic findings			
+3/+3q†	29/119 (24%)	16/39 (41%)	.004§
del(7q)	47/119 (39.5%)	13/39 (33%)	.491
+12	7/119 (6%)	3/39 (7.7%)	.709
14q32	9/119 (7%)	3/39 (7%)	1.000
del <i>TP53</i>	11/55 (20%)	6/20 (30%)	.367
+18†	8/119 (7%)	7/39 (18%)	.038§
6q†	7/119 (6%)	9/39 (23%)	.004§
Abnormal karyotype	90/119 (75.6%)	32/38 (84.2%)	.269
Single anomaly‡	28/90 (31%)	4/32 (12.5%)	.040§
More than or equal to 3 alterations	46/90 (51%)	18/32 (56.3%)	.073

WBC indicates white blood cells.

*Karyotype and FISH information was used for the statistical analysis of +3/+3q.

†Never as a single aberration.

‡Twelve of 28 patients carried 7q deletion as a single anomaly.

§Significant difference ($P < .05$).

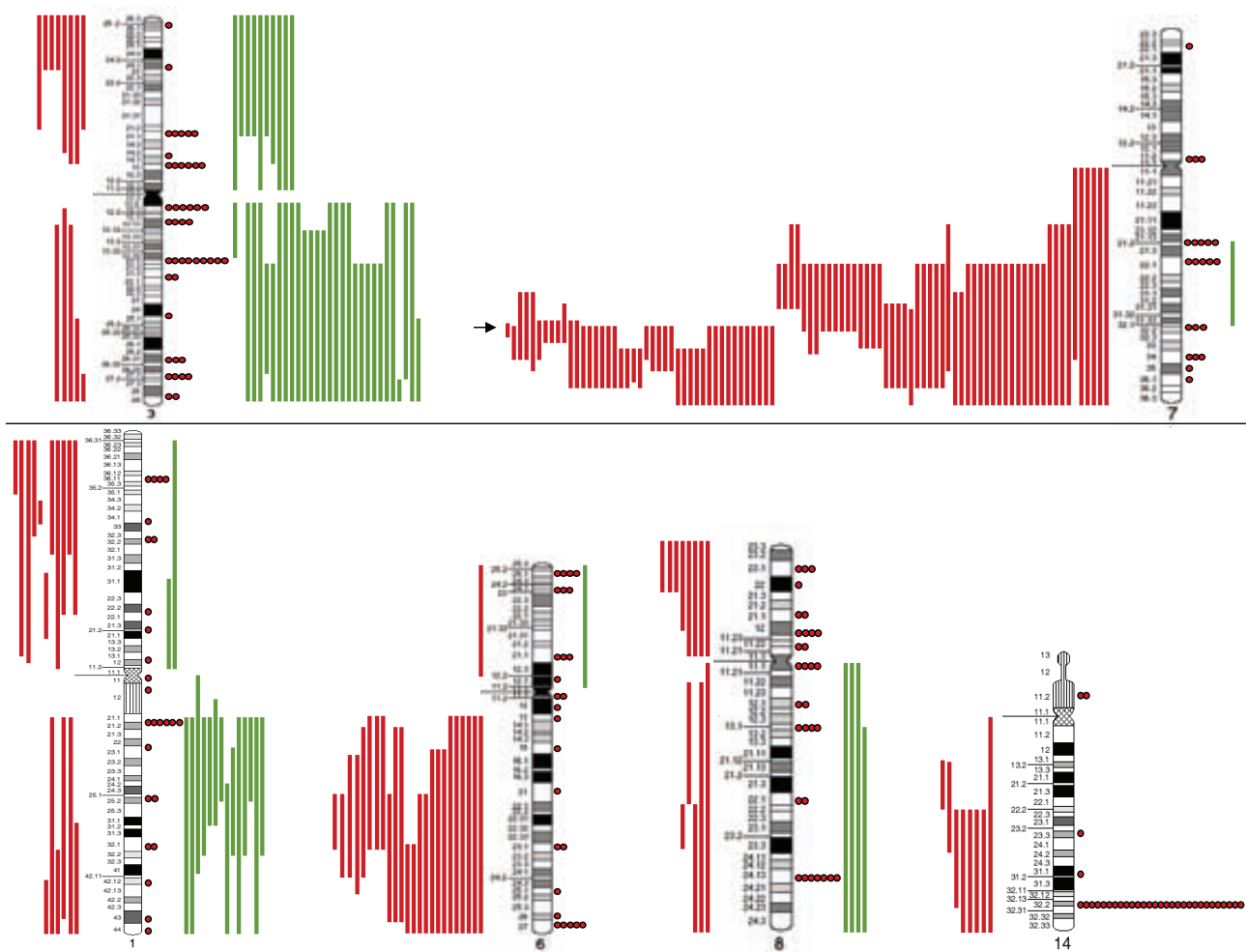


Figure 2. SORIs of the main chromosomes involved in SMZL. Red lines represent losses; green lines, gains; red dots, rearrangements; and arrow, the Smallest Overlapping Region of Imbalance (SORI) 7q32.1-q32.2. The most frequent chromosomal regions affected by structural abnormalities were 7q (109 cases), 3q (42 cases), 14q (40 cases), 6q (37 cases), 1q (30 cases), and 8q (29 cases).

karyotypes were more frequent among CD5⁺ cases; however, the difference was not statistically significant ($P = .073$). CD5 expression was not associated with trisomy 12, 14q32 translocations, or *TP53* deletions. In contrast, deletion 7q as a single abnormality was less frequent in CD5⁺ versus CD5⁻ cases (1 of 13 cases, 7.7%; vs 13 of 47 cases, 27.7%; $P = .264$).

Immunoglobulin gene repertoire, mutational analysis, and associations with cytogenetic findings

Sequence information about the clonotypic *IGHV-D-J* rearrangements was available in 100 cases of the present study. The most frequent *IGHV* gene was *IGHV1-2* (32 cases, 32%), followed by *IGHV4-34* (11 cases, 11%) and *IGHV3-23* (10 cases, 10%). After the 98% identity cut-off value, 59 of 100 cases (59%) from the present series carried *IGHV* genes with less than 98% identity to germline and were defined as “mutated,” whereas the remainder (41 of 100 cases, 41%) carried “unmutated” *IGHV* genes; within the latter subgroup, only 14 cases carried *IGHV* genes with 100% germline identity. At the individual gene level, the distribution of rearrangements of *IGHV* genes according to mutation status varied significantly; in particular, *IGHV1-2* rearrangements were more frequently unmutated compared with other *IGHV* genes (43.9% vs 23.7%; $P = .033$).

At cohort level, significant differences were not identified with regard to clinical features or outcome between cases with mutated versus unmutated *IGHV* genes. However, 7q and *TP53* deletions were significantly more frequent in the latter group ($P = .006$ and $P = .045$, respectively). At the individual *IGHV* gene level, *IGHV1-2* usage was associated with a lymphocyte count lower than $5 \times 10^9/L$ ($P = .024$) and Hb level less than 12g/dL ($P = .01$). Notably, significant differences were noted with regard to cytogenetic profiles between cases expressing the *IGHV1-2* versus other *IGHV* genes. In particular, 7q deletions, alterations at 14q, and abnormal karyotypes were significantly more frequent in the *IGHV1-2* group ($P = .002$, $P = .011$, and $P = .049$, respectively; supplemental Table 5).

Prognostic factors for survival

The results of the univariate and multivariate analysis identifying significant prognostic factors for OS are summarized in Table 5. On univariate analysis, age more than 65 years, Hb level less than 12 g/dL, and serum β_2 -microglobulin level more than 3 mg/L were associated with a shorter survival (median 6.4 vs 14.5 years, $P < .001$; median 8.5 vs 14 years, $P = .004$; and median 8.3 vs 14.5 years, $P = .008$, respectively). Patients with a lymphocyte count less than $4 \times 10^9/L$ and a platelet count less than 100×10^9

Table 5. Clinicobiologic parameters influencing OS on univariate and multivariate analysis

Parameter	HR	OS, P
Univariate analysis		
Age > 65 y	—	.000
Hb < 12 g/dL	—	.004
β_2 -Microglobulin level > 3 mg/L	—	.008
More than or equal to 2 cytogenetic alterations	—	.038
Alterations at 14q	—	.013
14q deletions	—	.007
<i>TP53</i> deletion (FISH)	—	.035
Lymphocytes < $4 \times 10^9/L$	—	.027
Platelet count < 100×10^9	—	.092
CD5 PB expression	—	.898
<i>IGHV</i> mutational status	—	.301
Karyotype, abnormal versus normal	—	.302
7q deletion	—	.494
+3/+3q	—	.379
6q deletion	—	.307
Multivariate analysis		
Age > 65 y	3.102	.000
Hb < 12 g/dL	1.915	.014

HR indicates hazard risk; —, not applicable; and PB, peripheral blood.

had a poor prognosis and shorter survival (7.2 vs 11.6 years, $P = .027$ and 6 vs 10.8 years, $P = .092$, respectively; supplemental Figure 2). CD5 expression was not found to affect survival ($P = .898$).

A total of 74 patients were stratified according to the Intergruppo Italiano Linfomi Score¹⁸ in 3 prognostic groups: low-risk ($n = 26$), intermediate-risk ($n = 24$), and high-risk ($n = 24$; Table 1). The median survival times for each risk group did not differ significantly (14.5, 8.2, and 7.2 years, respectively; $P = .256$).

Cytogenetic findings had an impact on OS. Patients with a single anomaly had a better survival than those with 2 or more aberrations (median 14 vs 8.4 years, $P = .038$); however, no differences were observed between patients with 2, 3, or more chromosomal alterations. Furthermore, patients with 2 or more cytogenetic aberrations had a higher risk of progression than patients with normal karyotype or a single anomaly (53.3% vs 37%, respectively, $P = .041$); the latter 2 groups experienced similar survival ($P = .619$). Moreover, we studied the association between progression and the most frequent genomic aberrations detected by classic cytogenetic and/or FISH analysis (7q–, +3/+3q, and 14q aberrations; 6q–, 1q+, and 8q alterations; and *TP53* deletions); however, no significant associations were identified, probably because of the heterogeneity of the karyotypes.

In contrast, a significantly shorter survival was noted for patients with recurrent 14q abnormalities (3.5 vs 10.8 years, $P = .013$), which mostly accounted for the markedly inferior prognosis of cases with 14q deletion. Indeed, the OS of such cases was only 2.6 years compared with patients with 14q32 translocations who had an OS of 10.6 years ($P = .007$). Deletion of 7q (9 vs 10.8 years, $P = .613$), gain of 3q by cytogenetics and FISH (9 vs 10.6 years, $P = .379$), trisomy 18 (10.8 vs 10.8 years, $P = .960$), and 6q deletion (7.1 vs 10.8 years, $P = .307$) did not have any influence on survival. Finally, the presence of *TP53* deletions was an unfavorable indicator (median OS 5.6 vs 11.6 years, $P = .035$; Figure 3).

On multivariate analysis, the only parameters that maintained a negative prognostic influence on OS were hemoglobin less than 12 g/dL and age more than 65 years (Table 5).

Discussion

Cytogenetic findings

We document the chromosomal alterations identified in a series of 330 SMZL patients, by far the largest to date, with the use of conventional karyotype and FISH. Previous studies on smaller patient cohorts have reported clonal chromosomal abnormalities, with an incidence ranging from 43% to 87%.^{6-9,10-12} These discrepancies could be attributed to small size of most series as well as different inclusion criteria, given that some studies included patients with or without lymphocytosis or were performed after treatment. In addition, at least a subset of cases included in our analysis may represent diffuse red pulp small B-cell lymphoma, a provisional entity recently included in the last review of the WHO classification. Because of the low number of cases with splenic histology available, the cases with diffuse pattern of splenic infiltration were classified according to SBLG.³

In the present series, the overall incidence of chromosomal abnormalities was 72%, mainly (53%) in the form of a complex karyotype. Most frequently involved (in order of frequency) were chromosomes 7, 3, 1, 8, 6, 12 and 14. In agreement with previous studies,^{6-9,10-12} albeit on significantly smaller series, deletion 7q21q36, gain 3/3q, 14q32 translocations and deletion 6q were the predominant structural alterations. The most frequent numerical abnormalities were whole or partial trisomy 3, trisomy 18, and trisomy 12 (in the latter 2 cases, usually associated with gain of chromosome 3^{10,12,19-21}; supplemental Table 6).

Trisomy 3 is a common abnormality in marginal zone B-cell lymphomas, in particular nodal and extranodal MALT lymphomas.^{8,10,19,21} It has been suggested that a gene dosage effect for genes localized on 3q rather than a specific gene disruption could be involved in the development and/or disease progression of marginal zone B-cell lymphomas.²² However, unlike other marginal cell lymphomas, in which whole trisomy 3 is the most frequent gain, in SMZL the gain specifically occurs at 3q²³ and is more frequently associated with complex karyotypes. Taking into account the variety of breakpoints and partners involved in 3q rearrangements, these structural aberrations probably represent secondary events.

Deletion of 7q was the most frequent abnormality in the present series, detected in 39% of patients, a higher incidence than previously reported (17%-20%)^{6,10} but similar to that documented by Mateo et al who evaluated loss of heterozygosity at chromosome 7q.²⁴ In our study, deletion 7q was found to span from 7q21 to 7q36; 7q22 and 7q32 were the most common breakpoints, whereas 7q32.1-q32.2 was the smallest overlapping region of imbalance as previously reported by conventional cytogenetics, loss of heterozygosity, FISH, and comparative genomic hybridization (CGH).^{19,23,25} A recent study by array CGH²⁶ in SMZL has demonstrated a high incidence of major imbalances, including, among others, deletions at 7q (7q22-q36). The authors suggested that the *SHH* (7q36.2) and *POT1* (7q32.32) genes could have a potentially relevant role in the pathogenesis of SMZL.²⁶ Of note, in 22 cases of our series, deletion 7q was found as a single anomaly, further supporting the notion that, unlike other aberrations, it may represent a primary pathogenic event in SMZL.

A significant minority of cases (35 of 239, 15%) carried abnormalities affecting the immunoglobulin (*IG*) loci, *IGH* (14q32), *IGK* (2p12), or *IGL* (22q11). However, recurrent translocations

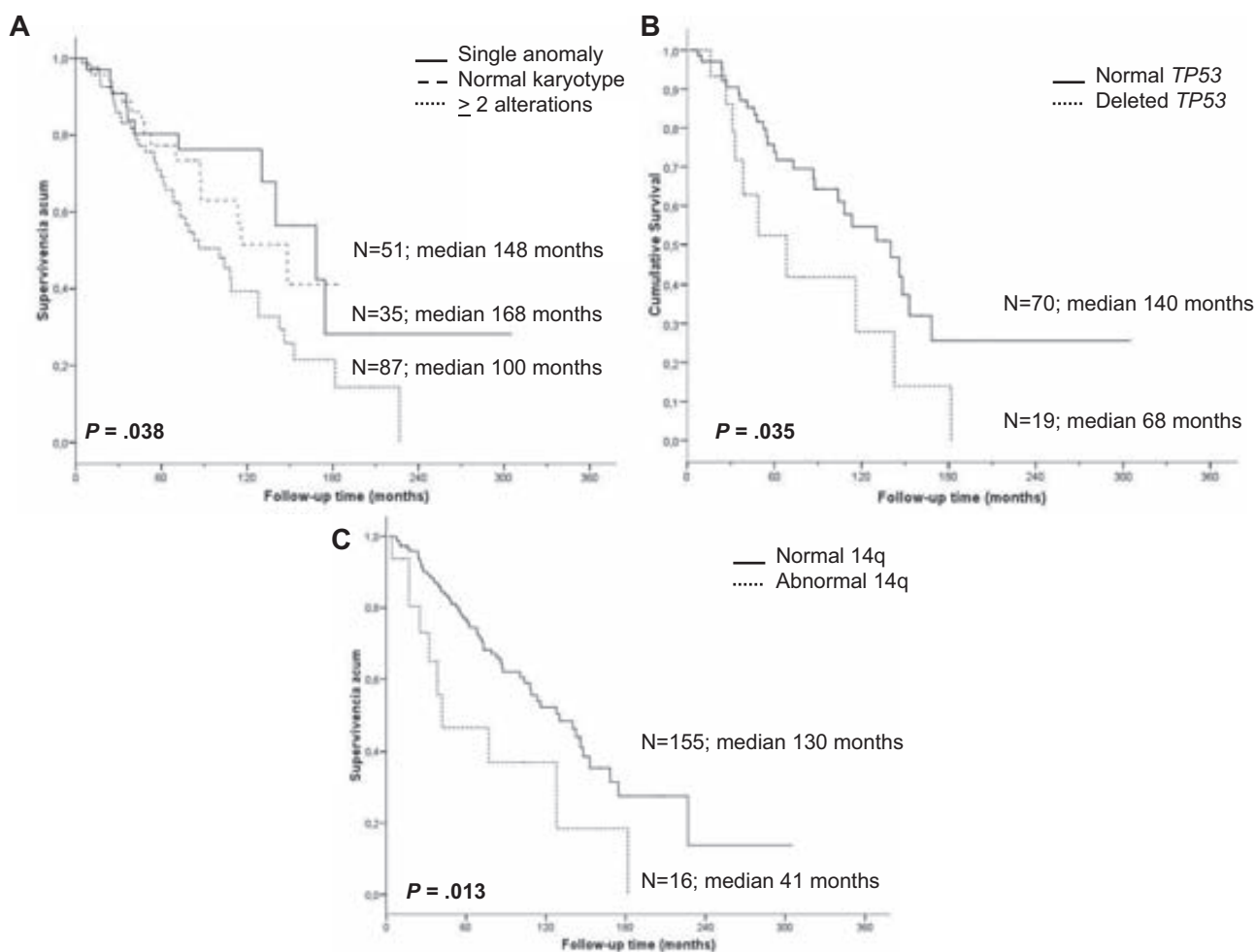


Figure 3. Kaplan-Meier survival curves of the cytogenetic findings with prognostic impact. (A) Complexity of karyotype. (B) *TP53* status by FISH. (C) 14q aberrations.

found in follicular lymphoma, mantle cell lymphoma (MCL), or MALT lymphoma were not identified; only 1 case carried $t(8;22)(q24;q11)$, typical of Burkitt lymphoma. A previous FISH study on 220 paraffin-embedded SMZL specimens documented *IG* translocations with different partner chromosomes in 6% of cases, with just a single case exhibiting coexistence of this type of aberration with deletion 7q.²⁷ This is in contrast to our series, where a concurrent *IG* translocation was found in 17 of 35 cases (49%) carrying deletion 7q. This discrepancy may result from different methodologies and/or the status of the specimens analyzed (fresh vs paraffin-embedded).

Our study confirms the low incidence of certain 14q32 translocations, for instance, $t(6;14)(p21;q32)$ and $t(9;14)(p13;q32)$.^{11,28,29} Translocation $t(14;19)(q32;q13)$, a rare abnormality in B-cell disorders, documented in cases with “atypical” CLL, small B-cell unclassifiable CD5⁺ leukemia, and various other B-cell malignancies,³⁰⁻³² was also rare (4 of 330 cases; 1.2%). Furthermore, in all cases of the present series carrying $t(14;19)(q32;q13)$, this aberration was associated with $del(7q)$ and a complex karyotype, in keeping with a previous report.³⁰

Eight cases exhibited the $del(14q)$ abnormality, which has been reported in low-grade B-cell malignancies, particularly CLL,³³ and often associated with trisomy 12 and unmutated *IGHV* genes. In the present series, no case with 14q deletion was associated with trisomy 12, as in a previous report.³³ Our findings suggest that 14q deletions are recurrent but infrequent in SMZL.

Comparison of CD5⁺ versus CD5⁻ SMZL

The incidence of CD5 expression in the present series was similar to previous reports.⁴ It has been suggested that CD5 expression may portend a more aggressive clinical course in SMZL.³⁴ Nevertheless, our data do not support this suggestion, as there were no differences in survival or most other clinicobiologic parameters between CD5⁺ versus CD5⁻ cases. Similar results were reported by Baseggio et al in a series of 24 CD5⁺ SMZLs, in which no differences in outcome were found.³⁵

Notably, however, we document here, for the first time, that CD5⁺ cases have a cytogenetic make-up different from that of CD5⁻ cases, with a higher frequency of trisomy 3/3q, trisomy 18, and deletion 6q and a lower incidence of deletion 7q as a single anomaly, in the latter case contrasting data recently reported by Baseggio et al.³⁵ In addition, in contrast to previous studies by others and our group that have documented a higher incidence of *TP53* deletion in CD5⁺ SMZL,^{36,37} in this much larger series, *TP53* deletion was not associated with CD5 expression.

The possibility that the CD5⁺ cases from our series were indeed $t(11;14)(q13;q32)$, cyclin D1⁻ MCL cannot be formally excluded. However, in our cases, the absence of generalized lymphadenopathy at diagnosis and the indolent clinical course are in contrast to what has been recently reported for cyclin D1⁻ MCL³⁸ and argue against this possibility. In addition, all CD5⁺ cases from our series were negative for $t(11;14)(q13;q32)$, thereby

excluding the diagnosis of indolent MCL, because, to the best of our knowledge, all indolent MCLs display this aberration.³⁹

The different cytogenetic makeup of the 2 subgroups of SMZL defined by CD5 expression reported here are notable yet admittedly difficult to interpret, especially given the relative homogeneity of both subgroups regarding almost all other clinicobiologic parameters. Therefore, future, prospective studies are strongly warranted to confirm these findings and explore their potential prognostic significance.

***IGHV* gene repertoire and mutational status**

In keeping with previous reports,^{14,40,41} our study documents a highly restricted *IGHV* gene repertoire, with biased usage of the *IGHV1-2* gene. After the 98% identity cut-off value, which is widely used in CLL to make the clinically relevant distinction between “mutated” and “unmutated” cases,⁴²⁻⁴⁴ 59 of 100 sequences (59%) from our series were defined as “mutated,” whereas the remainder (41 of 100 sequences; 41%) had “unmutated” *IGHV* genes.

The prognostic implications of *IGHV* gene mutational status in SMZL are still contested.^{15,40,45,46} Some studies have reported an association between unmutated *IGHV* genes and a high and intermediate risk according to the Intergruppo Italiano Linfomi score,⁴⁵ del(7q), an adverse clinical course^{15,47} and 17q deletion.⁴⁷ In keeping with previous reports,¹⁵ we observed an association between 7q deletion and unmutated *IGHV* genes; however, these parameters did not have an impact in OS. Nevertheless, given the retrospective nature of our study and the heterogeneity of therapeutic regimens, this issue merits further evaluation in a prospective fashion.

Interestingly, we identified a significantly higher frequency of del(7q) in cases expressing the *IGHV1-2* versus all other *IGHV* genes (65.6% vs 32.4%, $P = .002$), independently of the mutational status. This biased cytogenetic profile, reported here for the first time, recalls the situation in CLL, where different groups have recently published evidence pointing to recurrent, “stereotyped” cytogenetic findings in different groups defined by *IGHV* gene usage and molecular features, for example, exclusive del(13q) in cases expressing stereotypical *IGHV4-34* gene rearrangements assigned to subset 4,^{48,49} t(14;19)(q32;q13) and concurrent trisomy 12 in cases expressing stereotypical *IGHV4-39* gene rearrangements assigned to subset 8.^{30,48,50} Although the underlying pathogenetic mechanisms are elusive and will probably prove hard to decipher, the identified association is too striking to ignore and might be considered as evidence of genetic evolution along distinctive, perhaps B-cell receptor-mediated, pathways for subgroups of SMZL cases characterized by distinctive B-cell receptor structures.

Prognosis

SMZL usually runs an indolent clinical course, but some patients manifest with a more aggressive disease. Clinical and cytogenetic parameters with prognostic value are not well established. Only a few studies, including small numbers of cases and analyzing selected parameters, have been reported (supplemental Table 7). To the best of our knowledge, this is the first report including a large number of SMZL cases and also attempting a comprehensive assessment of the prognostic implications of various clinicobiologic parameters, with a special emphasis on cytogenetic profiles.

Considering clinical variables, univariate associations for shorter OS were identified for age more than 65 years, Hb less than

12 g/dL, and serum β_2 -microglobulin more than 3 mg/L, in keeping with previous reports.^{45,46,50-53} Hb less than 12 g/dL and age more than 65 years were the only parameters that maintained prognostic significance with regard to OS on multivariate analysis, in concordance with previous reports by Parry-Jones et al⁵³ and Arcaini et al.¹⁸ However, we could not confirm the prognostic impact of serum LDH and albumin, as proposed by the Interruppo Italiano Linfomi, probably because the number of cases with this information was relatively small. The finding that only non-disease-specific parameters (ie, age and Hb) retained prognostic significance for OS on multivariate analysis might be taken to imply that death was the result of incidental causes, at least in a proportion of cases; alternatively, the evaluated biomarkers could be predictive of progression but not response to therapy. These issues will require clarification in large prospective studies.

The heterogeneity of chromosomal aberrations and the high incidence of complex karyotypes in SMZL hinder the assessment of the prognostic impact of individual abnormalities. However, our data indicate that the presence of 2 or more aberrations correlates with a shorter survival. Interestingly, patients with normal karyotype showed an intermediate prognosis. Such cases may carry other abnormalities that are undetectable by G/R-banding or FISH; in these cases, the application of single nucleotide polymorphism/CGH arrays might be useful to find gains and losses.

Our findings do not support results from previous small studies that reported an adverse prognostic impact of del(7q)¹⁵ and/or associations between trisomy 3, 6q deletion, 7q deletion, 8p deletion, and trisomy 12.¹² Instead, we provide, for the first time, evidence to suggest that abnormalities at 14q, especially deletion 14q, may confer an inferior prognosis. However, given that the number of cases with deletion 14q was small, this observation will require validation in larger series, especially as this aberration was usually detected in the context of a complex karyotype, probably accounting for the unfavorable prognosis.

In conclusion, although our study was retrospective and multicentric and had limitations inherent to such analysis (including missing information and nonhomogeneous treatment), it provides a comprehensive overview of the cytogenetic profile of SMZL, identifies undescribed and potentially prognostically relevant cytogenetic subgroups, and highlights the need to perform cytogenetics for diagnostic and prognostic stratification in these patients. Furthermore, the present study reinforces the clinical and biologic heterogeneity of SMZL, which creates the need for future prospective analyses in large series to find powerful prognostic markers specifically associated with this entity.

Acknowledgments

The authors thank Dr Eveline Callet-Bauchu (Unité de Cytogénétique et Biologie Moléculaire des Hemopathies Malignes, Service d'Hématologie Biologique, Center de Biologie Sud, Lyon, France), Dr José Ángel Martínez Climent (Centro de Investigación de Navarra, Pamplona, Spain), Dr Jesús María Hernández (Servicio de Hematología, Hospital Universitario, Salamanca, Spain), Dr Pedro Martínez (Laboratorio de Genética, Hospital de Toledo, Toledo, Spain), Dr Isabel Granada (Servei d'Hematologia, Hospital Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain), Dr Ana Carrió (Servei d'Hematopatologia, Hospital Clínic i Provincial, Barcelona, Spain), Dr Dolors Costa (Servei d'Hematopatologia, Hospital Clínic i Provincial, Barcelona, Spain), Dr Verónica Fernández (Servei d'Hematopatologia, Hospital Clínic i Provincial, Barcelona, Spain),

Dr Elias Campo (Servei d'Hematopatologia, Hospital Clínic i Provincial, Barcelona, Spain), Dr Alicia Domingo (Laboratori de Citologia, Hospital de Bellvitge, Barcelona, Spain), and Dr Soledad Woessner (Escola de Citologia Hematològica Soledad Woessner-IMAS, Barcelona, Spain) for providing cases as well as Sergi Mojal for assisting us in the statistical analysis (Departament Assessorament Bioestadístic, Institut Municipal d'Assistència Sanitària, Barcelona, Spain).

This work was supported in part by Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Sanidad y Consumo, Spain, Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer (grants RD06/0020/FEDER and RD07/0020/2004).

Authorship

Contribution: M.S. and F.S. designed and performed research, performed cytogenetic analysis, revised, collected, and analyzed clinical data, wrote the paper, and gave final approval; C.B. performed research, collected all cytogenetic data, and gave final approval; D.O. designed and performed research, collected clinical data, and gave final approval; K.S. performed molecular studies, collected clinical data, drafted the *IGVH* results and discussion sections, assisted in the corrections of the paper, and gave final approval; J.D., S.G., A.A., A.G., M.J.C., and E.L. performed

cytogenetic analysis, collected clinical data, and gave final approval; E.M. performed cytologic and immunophenotypic studies, assisted in the corrections of the paper, and gave final approval; A.T.-G. performed morphologic and immunophenotypic studies and IGHV mutational analysis, collected clinical data, and gave final approval; F.B. and P.F. performed morphologic and immunophenotypic studies; C.T. performed cytologic, histologic, and immunophenotypic studies and gave final approval; Z.D. performed molecular studies, collected clinical data, and gave final approval; F.M., G.V., and A.S. collected clinical data and gave final approval; A.F. performed immunophenotypic studies, collected clinical data, and gave final approval; M.M. and T.P. performed histologic studies, collected clinical data, and gave final approval; L.F. performed cytologic and immunophenotypic studies, collected clinical data, and gave final approval; B.E. and I.W. performed cytogenetic analysis and gave final approval; M.G.-G. performed statistical analysis and gave final approval; S.S. performed histologic studies and gave final approval; and M.A.P. designed and performed research and histologic studies and gave final approval.

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

Correspondence: Francesc Solé, Servei de Patologia, Laboratori de Citogenètica Molecular, Hospital del Mar, Passeig Marítim, 25-29, 08003 Barcelona, Spain; e-mail: fsol@parcdesalutmar.cat.

References

- Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. 4th ed. Lyon, France: IARC Press; 2008.
- Mollejo M, Menarguez J, Lloret E, et al. Splenic marginal zone lymphoma: a distinctive type of low-grade B-cell lymphoma: a clinicopathological study of 13 cases. *Am J Surg Pathol*. 1995; 19(10):1146-1157.
- Matutes E, Oscier D, Montalban C, et al. Splenic marginal zone lymphoma proposals for a revision of diagnostic, staging and therapeutic criteria. *Leukemia*. 2008;22(3):487-495.
- Matutes E, Morilla R, Owusu-Ankomah K, Houlihan A, Catovsky D. The immunophenotype of splenic lymphoma with villous lymphocytes and its relevance to the differential diagnosis with other B-cell disorders. *Blood*. 1994;83(6):1558-1562.
- Thieblemont C, Nasser V, Felman P, et al. Small lymphocytic lymphoma, marginal zone B-cell lymphoma, and mantle cell lymphoma exhibit distinct gene-expression profiles allowing molecular diagnosis. *Blood*. 2004;103(7):2727-2737.
- Oscier DG, Matutes E, Gardiner A, et al. Cytogenetic studies in splenic lymphoma with villous lymphocytes. *Br J Haematol*. 1993;85(3):487-491.
- Dierlamm J, Pittaluga S, Wlodarska I, et al. Marginal zone B-cell lymphomas of different sites share similar cytogenetic and morphologic features. *Blood*. 1996;87(1):299-307.
- Dierlamm J, Michaux L, Wlodarska I, et al. Trisomy 3 in marginal zone B-cell lymphoma: a study based on cytogenetic analysis and fluorescence in situ hybridization. *Br J Haematol*. 1996; 93(1):242-249.
- Troussard X, Mauvieux L, Radford-Weiss I, et al. Genetic analysis of splenic lymphoma with villous lymphocytes: a Groupe Français d'Hématologie Cellulaire (GFHC) study. *Br J Haematol*. 1998; 101(4):712-721.
- Sole F, Salido M, Espinet B, et al. Splenic marginal zone B-cell lymphomas: two cytogenetic subtypes, one with gain of 3q and the other with loss of 7q. *Haematologica*. 2001;86(1):71-77.
- Sole F, Espinet B, Salido M, et al. Translocation t(6;14)(p12;q32): a novel cytogenetic abnormality in splenic lymphoma with villous lymphocytes. *Br J Haematol*. 2000;110(1):241-243.
- Callet-Bauchu E, Baseggio L, Felman P, et al. Cytogenetic analysis delineates a spectrum of chromosomal changes that can distinguish non-MALT marginal zone B-cell lymphomas among mature B-cell entities: a description of 103 cases. *Leukemia*. 2005;19(10):1818-1823.
- Gruszka-Westwood AM, Hamoudi RA, Matutes E, Tuset E, Catovsky D. p53 abnormalities in splenic lymphoma with villous lymphocytes. *Blood*. 2001; 97(11):3552-3558.
- Ruiz-Ballesteros E, Mollejo M, Rodriguez A, et al. Splenic marginal zone lymphoma: proposal of new diagnostic and prognostic markers identified after tissue and cDNA microarray analysis. *Blood*. 2005;106(5):1831-1838.
- Algara P, Mateo MS, Sanchez-Beato M, et al. Analysis of the IgV(H) somatic mutations in splenic marginal zone lymphoma defines a group of unmutated cases with frequent 7q deletion and adverse clinical course. *Blood*. 2002;99(4):1299-1304.
- International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature, Shaffer LG, Tommerup N. *ISCN 2005: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (2005). Recommendations of the International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature*. Basel, Switzerland: Karger; 2005.
- Baro C, Salido M, Espinet B, et al. New chromosomal alterations in a series of 23 splenic marginal zone lymphoma patients revealed by Spectral Karyotyping (SKY). *Leuk Res*. 2008;32(5): 727-736.
- Arcaini L, Lazzarino M, Colombo N, et al. Splenic marginal zone lymphoma: a prognostic model for clinical use. *Blood*. 2006;107(12):4643-4649.
- Gruszka-Westwood AM, Hamoudi R, Osborne L, Matutes E, Catovsky D. Deletion mapping on the long arm of chromosome 7 in splenic lymphoma with villous lymphocytes. *Genes Chromosomes Cancer*. 2003;36(1):57-69.
- Andersen CL, Gruszka-Westwood A, Atkinson S, et al. Recurrent genomic imbalances in B-cell splenic marginal-zone lymphoma revealed by comparative genomic hybridization. *Cancer Genet Cytogenet*. 2005;156(2):122-128.
- Brynes RK, Almaguer PD, Leathery KE, et al. Numerical cytogenetic abnormalities of chromosomes 3, 7, and 12 in marginal zone B-cell lymphomas. *Mod Pathol*. 1996;9(10):995-1000.
- Gazzo S, Baseggio L, Coignet L, et al. Cytogenetic and molecular delineation of a region of chromosome 3q commonly gained in marginal zone B-cell lymphoma. *Haematologica*. 2003; 88(1):31-38.
- Hernandez JM, Garcia JL, Gutierrez NC, et al. Novel genomic imbalances in B-cell splenic marginal zone lymphomas revealed by comparative genomic hybridization and cytogenetics. *Am J Pathol*. 2001;158(5):1843-1850.
- Mateo M, Mollejo M, Villuendas R, et al. 7q31-32 allelic loss is a frequent finding in splenic marginal zone lymphoma. *Am J Pathol*. 1999;154(5): 1583-1589.
- Andersen CL, Gruszka-Westwood A, Ostergaard M, et al. A narrow deletion of 7q is common to HCL, and SMZL, but not CLL. *Eur J Haematol*. 2004;72(6):390-402.
- Vega F, Cho-Vega JH, Lennon PA, et al. Splenic marginal zone lymphomas are characterized by loss of interstitial regions of chromosome 7q, 7q31.32 and 7q36.2 that include the protection of telomere 1 (POT1) and sonic hedgehog (SHH) genes. *Br J Haematol*. 2008;142:216-226.
- Remstein ED, Law M, Mollejo M, Piris MA, Kurtin PJ, Dogan A. The prevalence of IG translocations and 7q32 deletions in splenic marginal zone lymphoma. *Leukemia*. 2008;22(6):1268-1272.
- Sonoki T, Harder L, Horsman DE, et al. Cyclin D3 is a target gene of t(6;14)(p21.1;q32.3) of mature B-cell malignancies. *Blood*. 2001;98(9):2837-2844.
- Baro C, Salido M, Domingo A, et al. Translocation t(9;14)(p13;q32) in cases of splenic marginal zone lymphoma. *Haematologica*. 2006;91(9): 1289-1291.

30. Martin-Subero JI, Ibbotson R, Klapper W, et al. A comprehensive genetic and histopathologic analysis identifies two subgroups of B-cell malignancies carrying a t(14;19)(q32;q13) or variant BCL3-translocation. *Leukemia*. 2007;21(7):1532-1544.
31. Michaux L, Dierlamm J, Wlodarska I, et al. t(14;19)/BCL3 rearrangements in lymphoproliferative disorders: a review of 23 cases. *Cancer Genet Cytogenet*. 1997;94:36-43.
32. Huh YO, Abruzzo LV, Rassidakis GZ, et al. The t(14;19)(q32;q13)-positive small B-cell leukemia: a clinicopathologic and cytogenetic study of seven cases. *Br J Haematol*. 2007;136(2):220-228.
33. Pospisilova H, Baens M, Michaux L, et al. Interstitial del(14)(q) involving IGH: a novel recurrent aberration in B-NHL. *Leukemia*. 2007;21(9):2079-2083.
34. Giannouli S, Paterakis G, Ziakas PD, Anagnostou D, Voulgarelis M. Splenic marginal zone lymphomas with peripheral CD5 expression. *Haematologica*. 2004;89(1):113-114.
35. Baseggio L, Traverse-Glehen A, Petinataud F, et al. CD5 expression identifies a subset of splenic marginal zone lymphomas with higher lymphocytosis: a clinico-pathologic, cytogenetic and molecular study of 24 cases. *Haematologica*. 2010;95(4):604-612.
36. Gimeno E, Salido M, Sole F, et al. CD5 negative and CD5 positive splenic marginal B-cell lymphomas have differential cytogenetic patterns. *Leuk Res*. 2005;29(8):981-982.
37. Boonstra R, Bosga-Bouwer A, van Imhoff GW, et al. Splenic marginal zone lymphomas presenting with splenomegaly and typical immunophenotype are characterized by allelic loss in 7q31-32. *Mod Pathol*. 2003;16(12):1210-1217.
38. Fernández V, Salameo O, Espinet B, et al. Genomic and gene expression profiling defines indolent forms of mantle cell lymphoma. *Cancer Res*. 2010;70(4):1408-1418.
39. Mozos A, Royo C, Hartmann E, et al. SOX11 expression is highly specific for mantle cell lymphoma and identifies the cyclin D1-negative subtype. *Haematologica*. 2009;94(11):1555-1562.
40. Traverse-Glehen A, Davi F, Ben Simon E, et al. Analysis of VH genes in marginal zone lymphoma reveals marked heterogeneity between splenic and nodal tumors and suggests the existence of clonal selection. *Haematologica*. 2005;90(4):470-478.
41. Stamatopoulos K, Belessi C, Papadaki T, et al. Immunoglobulin heavy- and light-chain repertoire in splenic marginal zone lymphoma. *Mol Med*. 2004;10(7):89-95.
42. Damle RN, Wasil T, Fais F, et al. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1999;94(6):1840-1847.
43. Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1999;94(6):1848-1854.
44. Ghia P, Stamatopoulos K, Belessi C, et al. European Research Initiative on CLL: ERIC recommendations on IGHV gene mutational status analysis in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2007;21(1):1-3.
45. Arcaini L, Zibellini S, Passamonti F, et al. Splenic marginal zone lymphoma: clinical clustering of immunoglobulin heavy chain repertoires. *Blood Cells Mol Dis*. 2009;42(3):286-291.
46. Kalpadakis C, Pangalis GA, Dimitriadou E, et al. Mutation analysis of IgVH genes in splenic marginal zone lymphomas: correlation with clinical characteristics and outcome. *Anticancer Res*. 2009;29(5):1811-1816.
47. Novara F, Arcaini L, Merli M, et al. High-resolution genome-wide array comparative genomic hybridization in splenic marginal zone B-cell lymphoma. *Hum Pathol*. 2009;40(11):1628-1637.
48. Athanasiadou A, Stamatopoulos K, Gaitatzi M, Stavroyianni N, Fassas A, Anagnostopoulos A. Recurrent cytogenetic findings in subsets of patients with chronic lymphocytic leukemia expressing IgG-switched stereotyped immunoglobulins. *Haematologica*. 2008;93(3):473-474.
49. Stamatopoulos K, Belessi C, Moreno C, et al. Over 20% of patients with chronic lymphocytic leukemia carry stereotyped receptors: pathogenetic implications and clinical correlations. *Blood*. 2007;109(1):259-270.
50. Chacon JI, Mollajo M, Munoz E, et al. Splenic marginal zone lymphoma: clinical characteristics and prognostic factors in a series of 60 patients. *Blood*. 2002;100(5):1648-1654.
51. Troussard X, Valensi F, Duchayne E, et al. Splenic lymphoma with villous lymphocytes: clinical presentation, biology and prognostic factors in a series of 100 patients. Groupe Français d'Hématologie Cellulaire (GFHC). *Br J Haematol*. 1996;93(3):731-736.
52. Thieblemont C. Non-MALT marginal zone lymphomas. *Ann Oncol*. 2008;19(suppl 4):iv70-3.
53. Parry-Jones N, Matutes E, Gruszka-Westwood AM, et al. Prognostic features of splenic lymphoma with villous lymphocytes: a report on 129 patients. *Br J Haematol*. 2003;120(5):759-764.

3.2. Article 2

Absència de mutacions del gen de la metiltransferasa d'histones (EZH2) en el limfoma de la zona marginal esplènica. *Leukemia Research* 2011;35(3):e23-4.

El gen *EZH2* s'ha observat mutat en pacients amb síndrome mielodisplàstica i preferentment en el grup amb deleció del cromosoma 7. Tenint en compte aquesta troballa s'ha volgut estudiar l'estat d'aquest gen en el grup de LZME donada la elevada incidència de delecions de 7q en aquesta malaltia. S'ha analitzat l'estat mutacional del gen *EZH2* en una cohort de pacients 29 LZME. En primer lloc es van analitzar els pacients amb deleció 7q detectada pel citogenètica (n=11) i després es va estendre l'estudi a casos amb LZME sense aquesta alteració (n=7 amb altres alteracions no del(7q); n=11 amb cariotip normal). No es van trobar mutacions patogèniques (canvi de marc de lectura o canvi de sentit). En conclusió, encara que la deleció de 7q és una alteració recurrent en el LZME, el gen *EZH2*, que està situat en 7q36.1, no es va trobar mutat en la nostra sèrie de pacients. Malgrat ser un estudi que implica una sèrie curta de pacients, els nostres resultats suggereixen que les mutacions en aquest gen no juguen un paper important en la patogènia d'aquesta malaltia.



Letter to the Editor

Absence of mutations of the histone methyltransferase gene *EZH2* in splenic b-cell marginal zone lymphoma

Morin et al. [1] recently reported recurrent somatic mutations of the *EZH2* gene, a histone methyltransferase that modifies the histone H3 (H3K27), in lymphomas of germinal-center (GC) origin. These somatic mutations are located within exon 15 that encodes a portion of the catalytic SET domain of the *EZH2* protein and result in the replacement of a single tyrosine (Tyr641) with a histidine, reducing the enzymatic activity of *EZH2* protein *in vitro*. This heterozygous mutation was found in 21.7% of GC diffuse large B-cell lymphoma (DLBCLs) and 7.2% of follicular lymphomas (FLs), but not in activated B-cell (ABC) DLBCLs, mantle-cell lymphoma or T-cell lymphomas.

EZH2 mutations have been described recently also in myeloid disorders [2–4]. Aberrations of this gene were observed in 12–23% of patients with myelodysplastic syndrome (MDS). Among them, both *EZH2* point mutations and microdeletions or UPDs at 7q36.1,

where the *EZH2* gene is located, were detected. The relation between chromosome 7 loss and *EZH2* mutations is yet to be clarified due to the small cohort harboring these mutation. *EZH2* pathogenic mutations, deletions or UPDs at 7q36.1 suggest that *EZH2* may act as a tumor suppressor for myeloid malignances. Of note, mutations altering Tyr641, which were detected in B-cell lymphoma patients, were not found in any of the patients with a myeloid disorder.

Splenic marginal zone lymphoma (SMZL) is a rare low-grade B-cell lymphoproliferative disorder with characteristic clinical, cytological, histological and immunophenotypic features. Approximately 70–80% of SMZL cases exhibit cytogenetic and/or molecular genetic abnormalities. However, no disease-specific genetic alteration has been found yet [5]. The most common cytogenetic abnormality present in 30–40% of the patients is the hemizygous 7q deletion, that extends from 7q21 to 7q36, but to date the genes targeted by 7q deletion remain unknown.

Table 1
Cytogenetic and *EZH2* mutational status in our series of SMZL.

Case	G-banding cytogenetics	Deletion location	Mutations in <i>EZH2</i>	Missense mutation
1	46,XY,del(7)(q32)[4]/46,XY[16]	7q32-qter	NO	NO
2	46,XX,del(7)(q32)[6]/46,XX[9]	7q32-qter	NO	NO
3	44-89,XX,+3,der(3)t(3;8)(q27;q24),del(6)(q15), der(6)t(6;8)(q23;q24), del(7)(q31q36),der(17;18)(q10;q10),+18, i(18)(q10)[cp4]	7q32-36	NO	D185H
4	46,XY,del(7)(q32)[3]/46,XY[17]	7q32-qter	NO	NO
5	47,XY,der(6)t(3;6),del(7)(q32),der(19)t(11;19)(q11;q13),+mar[5]/46,XY,der(6)t(3;6),add(18)(q23)[4]/46,XY,der(6)t(3;6), del(7)(q32)[4]/46,XY[3]	7q32-qter	NO	NO
6	46,XX,del(7)(q22q35)[2]/46,XX[18]	7q22-q36	NO	NO
7	46,XX,del(7)(q22)[17]/46,XX[3]	7q22-qter	NO	NO
8	46,XX,der(13)t(3;13)(q21;q14)[2]/46,XX,del(7)(q22),der(13)t(3;13)(q21;q14)[10]/46,XX [8]	7q32-qter	NO	NO
9	46,XX,del(7)(q32),add(19)(q13)[10]/46,XX[10]	7q22-qter	NO	NO
10	50,XX,+5,del(7)(q22),+der(7)t(3?;7)(p21;q22),i(8q)[8]/46XX[6]	7q22-qter	NO	NO
11	46,XY,del(7)(q22),add(8)(q24),del(13)(q14)[22]/46,XY[17]	7q22-qter	NO	D185H
12	46,XY[20]	NO	NO	D185H
13	46,XY[20]	NO	NO	NO
14	46,XX[20]	NO	NO	D185H
15	46,XX[20]	NO	NO	NO
16	46,XY[20]	NO	NO	NO
17	46,XY[20]	NO	NO	NO
18	46,XY[20]	NO	NO	NO
19	46,XX[20]	NO	NO	NO
20	46,XY[20]	NO	NO	NO
21	46,XY[20]	NO	NO	NO
22	46,XY,inv(9)(p11q12)c[20]	NO	NO	NO
23	46,XX,del(14)(q23)[20]	NO	NO	NO
24	45,X,-X [8]/46,XX[1]	NO	NO	NO
25	48,XX,+3,+12[20]	NO	NO	NO
26	47,XX,del(2)(p23),+5,add(17)(p13),+mar,2-4 dmin[6]/46,XX[14]/46,XX[24]	NO	NO	NO
27	46,XY,del(2)(p11),del(6)(q21),del(6)(q23),add(12)(q24),del(17)(p13)[5]/46,XY[25]	NO	NO	NO
28	46,XY,add(4)(q35),t(3;6)(q27;p21),-9,add(19)(p13),+2mar[20]	NO	NO	D185H
29	45,XY,t(1;14;17)(q11;q32;p13),del(13)(q14),-20,der(21)t(20;21)(q11;p11)[9]/46,XY[11]	NO	NO	NO

In light of the aforementioned observations we have analyzed the mutational status of the *EZH2* gene in a cohort of SMZL patients. To our knowledge no study has been published so far analyzing mutations in this entity. Firstly we analyzed patients with 7q deletion detected by G-banding cytogenetics and then we extended the study to cases without this aberration. A total of twenty-nine patients diagnosed with SMZL were screened for mutations in the *EZH2* gene (Table 1). From the whole cohort, 11 patients presented 7q deletion (three of them as single anomaly), 11 had a normal karyotype and 7 displayed other cytogenetic aberrations. The mutational analysis of the *EZH2* gene (reference sequence NM_004456.3) was performed by direct sequencing using primers covering the whole exome of the gene. DNA was extracted from purified B-cells from peripheral blood or from total lymphocytes in those samples where the percentage of pathologic B-cell was higher than 50%.

From the whole cohort of 29 SMZL patients, no pathogenic mutations (frameshift or nonsense mutations) were detected in the *EZH2* gene in any of the patients analyzed. Five patients harbored the missense mutation D185H in exon 6. This alteration has been previously described as a single nucleotide polymorphism in the NCBI SNP database (rs2302427) and was found in 2 cases with 7q deletion, 2 cases with normal karyotype and one case showing chromosomal abnormalities other than 7q deletion, indicating that there was no correlation of this SNP with the presence of cytogenetic alterations.

In conclusion, although 7q deletion is a recurrent alteration in SMZL, the *EZH2* gene, which is located at 7q36.1, was not mutated in our series of SMZL patients suggesting that mutations in this gene do not play an important role in the pathogeny of this disease.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments

Fellowship FI2008 (AGAUR) to LMA. We are grateful to Carme Melero, Maria Rodriguez and Raquel Longaron for their technical assistance. This work was supported (in part) by grants from Instituto de Salud Carlos III FEDER (RD09/0076/00036); Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer (RTICC, FEDER): RD07/0020/2004; Ministerio de Sanidad y Consumo (Spain): PI07/0586, the "Xarxa de Bancs de tumors sponsored by Pla Director d'On de Catalunya (XBTC)" and PI10/00366.

Authors' contributions: MS and LMA contributed equally to this study; MS wrote the paper, designed research, performed cytogenetic analysis, collected the data; LMA performed research, performed mutational analysis and wrote the paper; VA performed mutational analysis. AF designed research; BE performed cytogenetic analysis; MG, AS, CB and SS assisting in the selection of patients; LF designed research; BB designed and performed research, coordinate mutational studies; FS designed and performed research, performed cytogenetic analysis and all authors gave final approval.

References

- [1] Morin RD, Johnson NA, Severson TM, Mungall AJ, An J, Goya R, et al. Somatic mutations altering *EZH2* (Tyr641) in follicular and diffuse large B-cell lymphomas of germinal-center origin. *Nat Genet* 2010;42(2):181–5.
- [2] Nikoloski G, Langemeijer SM, Kuiper RP, Knops R, Massop M, Tönnissen ER, et al. Somatic mutations of the histone methyltransferase gene *EZH2* in myelodysplastic syndromes. *Nat Genet* 2010;42(8):665–7.
- [3] Ernst T, Chase AJ, Score J, Hidalgo-Curtis CE, Bryant C, Jones AV, et al. Inactivating mutations of the histone methyltransferase gene *EZH2* in myeloid disorders. *Nat Genet* 2010;42(8):722–6.
- [4] Makishima H, Jankowska AM, Tiu RV, Szpurka H, Sugimoto Y, Hu Z, et al. Novel homo- and hemizygous mutation in *EZH2* in myeloid malignancies. *Leukemia* 2010;(Aug).
- [5] Salido M, Baró C, Oscier D, Stamatopoulos K, Dierlamm J, Matutes E, et al. Cytogenetic aberrations and their prognostic value in a series of 330 splenic marginal zone B-cell lymphomas: a multicenter study of the splenic B-Cell Lymphoma Group. *Blood* 2010;(May) [Epub ahead of print].

Marta Salido^{a,b}

Luz Martinez-Avilés^{a,c}

Vera Ademà^{a,d}

Ana Ferrer^a

Blanca Espinet^a

Mar Garcia^a

Antonio Salar^e

Carles Besses^e

Lourdes Florensa^a

Sergi Serrano^a

Beatriz Bellosillo^a

Francesc Solé^{a,*}

^a *Servei de Patologia, Laboratori de Citogenètica Molecular, Laboratori de Biologia Molecular, Laboratori de Citologia Hematològica, Hospital del Mar-Parc de Salut Mar, GRETNHE, IMIM, Barcelona, Spain*

^b *Department of Biologia Animal, Vegetal i Ecologia, Spain*

^c *Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Spain*

^d *Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Unitat d'Antropologia Biològica, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain*

^e *Servei d'Hematologia Clínica, Hospital del Mar, IMAS, Barcelona, Spain*

* Corresponding author at: Laboratori de Citogenètica Molecular, Servei de Patologia, Hospital del Mar-Parc de Salut Mar, Passeig Marítim, 25-29, 08003 Barcelona, Spain. Tel.: +34 93 248 35 21; fax: +34 93 248 31 31. E-mail address: fsole@parcdesalutmar.cat (F. Solé)

4 October 2010

Available online 18 November 2010

4. DISCUSSIÓ

Els resultats presentats en aquesta tesi permeten aprofundir en el coneixement de la genètica del limfoma de la zona marginal esplènica (LZME). En el primer treball (Salido i cols., 2010) es descriu el perfil d'alteracions citogenètiques a una sèrie ampla de pacients diagnosticats d'un LZME (n=330), mitjançant les tècniques de citogenètica convencional (CC) i FISH. Els resultats d'aquest estudi han identificat les alteracions cromosòmiques més freqüents que permeten caracteritzar aquest tipus de limfoma i identificar subgrups citogenètics, no descrits prèviament, amb rellevància pronòstica, destacant la necessitat de realitzar estudis citogenètics tan pel diagnòstic com per la correcta estratificació pronòstica d'aquests pacients. A més, confirmen la elevada heterogeneïtat clínica i biològica del LZME.

En el segon treball (Salido i cols., 2011) s'analitza l'estat mutacional del gen *EZH2* (7q36.1) per la seva implicació a altres càncers, com les síndromes mielodisplàstiques, on s'han descrit mutacions a aquest gen associades a la pèrdua de 7q. Els resultats del nostre treball suggereixen que les mutacions a aquest gen no juguen un paper important a la patogènia d'aquesta entitat.

1.1. Perfil citogenètic del limfoma de la zona marginal esplènica (LZME).

Els estudis citogenètics previs sobre cohorts no gaire llargues de pacients amb un LZME detecten alteracions cromosòmiques clonals, amb una incidència que varia del 43% al 87% (Oscier i cols., 1993; Dierlamm i cols., 1996; Dierlamm i cols., 1996; Troussard i cols., 1998; Solé i cols., 2000; Solé i cols., 2001; Callet-Bauchu i cols., 2005). Aquestes discrepàncies es poden atribuir al baix nombre de pacients inclosos a la majoria de sèries publicades, així com els diferents criteris d'inclusió de malalts, atès que alguns estudis van incloure pacients amb o sense limfocitosi o van ser estudiats després de rebre tractament. A més, un subconjunt dels casos inclosos en la nostra sèrie poden pertànyer a la nova entitat provisional descrita en la última revisió de la WHO, el limfoma de cèl·lules B amb infiltració difusa de la polpa roja. A causa del baix

nombre de pacients amb la histologia de la melsa disponible, els casos amb patró difús de infiltració esplènica es classifiquen d'acord amb el criteris del SBLG (Matutes i cols., 2008).

En aquesta serie de 330 pacients amb un LZME, la incidència global d'alteracions cromosòmiques va ser del 72%, dels quals un 53% presentaven un cariotip complex. Els cromosomes més freqüentment alterats (en ordre de freqüència) van ser els cromosomes 7, 3, 1, 8, 6, 12 i 14. D'acord amb les sèries citogenètiques estudiades prèviament, la deleció de 7q21q36, el guany de 3/3q, les translocacions de 14q32 i la deleció de 6q van ser les alteracions estructurals predominants (Oscier i cols., 1993; Dierlamm i cols., 1996; Dierlamm i cols., 1996; Troussard i cols., 1998; Solé i cols., 2000; Solé i cols., 2001; Callet-Bauchu i cols., 2005). L'alteració numèrica més freqüent va ser la trisomia total o parcial del cromosoma 3, la trisomia 18 i la trisomia 12 (en els últims 2 casos, en general associada amb el guany del cromosoma 3) (Solé i cols., 2001; Callet-Bauchu i cols., 2005; Gruszka-Westwood i cols., 2003; Andersern i cols., 2005; Brynes i cols., 1996).

El guany del cromosoma 3/3q va ser l'alteració numèrica més freqüent (25% dels casos). La trisomia 3 és una alteració comú als limfomes de cèl·lules B de la zona marginal, en particular, dels limfomes nodal i MALT extranodal (Brynes i cols., 1996; Dierlamm i cols., 1996; Solé i cols., 2001; Gruszka-Westwood i cols., 2003). La incidència en el LZME varia considerablement entre les diferents series citogenètiques d'un 2% a un 36% (Oscier i cols., 1993; Troussard i cols., 1996; Gruska-Weswood i cols., 1999; Solé i cols., 2001). S'ha suggerit que un efecte de dosis gènica dels gens localitzats a 3q en lloc d'una alteració genètica específica podria ser la responsable de la progressió i/o desenvolupament del limfoma de cèl·lules B de la zona marginal (Gazzo i cols., 2003). No obstant això, a diferència del que passa a altres limfomes marginals en els quals es guanya tot el cromosoma 3 sencer, en el LZME el guany es produeix específicament a 3q (Hernández i cols., 2001) i es troba més freqüentment

associat amb cariotips complexos. Tenint en compte la varietat de punts de trencament i parelles de translocació que es reordenen amb 3q, aquestes alteracions estructurals probablement representen esdeveniments secundaris.

La deleció de 7q va ser l'alteració més freqüent en la nostra sèrie, que es va detectar en el 39% dels pacients amb cariotip alterat, una incidència major a la publicada prèviament en algunes sèries (17% -20%) (Oscier i cols., 1993; Solé i cols., 2001) però similar a la que descriu Mateo i cols. quan analitza la pèrdua d'heterozigositat (LOH) de la regió 7q (Mateo i cols., 1999) i similar a la publicada pel grup francès (Troussard i cols., 1998). En el nostre estudi, la deleció de 7q comprén de 7q21 a 7q36. Els punts de trencament més comuns van ser 7q22 i 7q32, mentre que 7q32.1-q32.2 es la regió mínima comunament delecionada (RMD). Aquesta regió crítica (7q32.1-q32.2) concorda amb la RMD descrita anteriorment mitjançant citogenètica convencional, LOH i HGC (Hernández i cols., 1997; Hernández i cols., 2001; Boonstra i cols., 2003; Gruszka-Westwood i cols., 2003; Andersen i cols., 2004). Estudis recents mitjançant arrays genòmics (aHGC) confirmen les troballes citogenètiques més freqüents d'aquest treball i les delecions a 7q (7q31-q32 i 7q22) com l'alteració més freqüent, tot i que presenten la limitació de incloure un número més baix de pacients (Vega i cols., 2008; Novara i cols., 2009; Watkins i cols., 2010; Rinaldi i cols. 2011, Robledo i cols. 2012). S'han suggerit diferents gens que podrien tenir un paper important en la patogènesi o en la progressió tumoral del LZME localitzats a 7q, com el *SHH* (7q36.2) i el *POT1*(7q32.32) (Vega i cols., 2008) i miRNAs com el miRNA29a que regula *TCL1* i el miRNA29b (Novara i cols., 2009; Rinaldi i cols., 2011).

És de destacar que en 22 casos de la nostra sèrie, la deleció a 7q es va trobar com a única alteració la qual cosa indica que, a diferència d'altres anomalies, la pèrdua a 7q pot representar un esdeveniment patogènic primari en el LZME.

Una minoria significativa dels casos (35 de 239, 15%) van presentar alteracions que afecten els gens de les immunoglobulines (IG), *IGH@* (14q32), *@IGK* (2p12), o *@IGL* (22q11). No obstant això, no es va detectar cap de les translocacions recurrents típiques del limfoma fol·licular, limfoma de cèl·lules del mantell (LCM), o limfoma MALT, i només es va detectar un cas amb una *t(8;22)(q24;q11)*, típica del limfoma de *Burkitt*. En un estudi de FISH en 220 mostres incloses en parafina de pacients diagnosticats d'un LZME es descriuen translocacions de IG amb cromosomes diferents en el 6% dels casos, amb només un cas que va presentar coexistència de translocació de IG i deleció de 7q (Remstein i cols., 2008). En contrast, a la nostra sèrie, 17 de 35 casos amb translocació de IG (49%) presenten també pèrdua de 7q. Aquesta discrepància pot resultar de les diferents metodologies utilitzades i/o el tipus de mostra analitzada (teixit fresc vs. parafina).

El nostre estudi confirma la baixa incidència d'algunes translocacions de 14q32, per exemple, la *t(6;14)(p21;q32)* i la *t(9;14)(p13;q32)*, reportades prèviament (Solé i cols., 2000; Sonoki i cols., 2001; Baró i cols., 2006). La *t(14;19)(q32;q13)* és una alteració poc freqüent a les neoplàsies de cèl·lules B, descrita en pacients diagnosticats de LLC atípica, de leucèmia de cèl·lules B petites inclassificable CD5+, i d'altres tumors malignes de cèl·lules B (Michaux i cols., 1997; Huh i cols., 2007; Martín-Subero i cols., 2007;). En la nostra sèrie de LZME la freqüència d'aquesta alteració també és molt baixa, només 4 de 330 casos (1.2%) presenten la *t(14;19)(q32;q13)*. A més, destacar que en els quatre casos aquesta alteració es va trobar juntament amb la pèrdua de 7q i la presència d'un cariotip complex, en acord amb una anterior publicació (Martín-Subero i cols., 2007).

En vuit casos es va detectar una pèrdua en el braç llarg del cromosoma 14 [del(14q)], alteració descrita prèviament a neoplàsies de cèl·lules B de baix grau. En concret a la LLC es troba associada a la presència de trisomia 12 i *IGHV* no-mutada (Pospisilova, i cols., 2007). A la nostra sèrie, cap dels casos amb deleció de 14q presentava trisomia

12, com ha estat descrit prèviament a altres LZME (Pospisilova, i cols., 2007). Les troballes d'aquest estudi suggereixen que la pèrdua de 14q és una alteració recurrent però poc freqüent en el LZME.

1.2. Comparativa de casos CD5+ versus CD5-.

La incidència de l'expressió CD5 en aquesta sèrie (25%) va ser similar a la publicada anteriorment. S'ha suggerit que l'expressió de CD5 pot predir un curs clínic més agressiu en el LZME. No obstant això, les nostres dades no recolzen aquesta idea, ja que no hem trobat diferències ni en la supervivència ni en la majoria de paràmetres clínico-biològics estudiats entre els pacients CD5 positius i CD5 negatius (Giannouli i cols., 2004). Posteriorment, Baseggio i cols. van publicar resultats similars en una sèrie de 24 LZME CD5+, en els quals no van trobar diferències en la supervivència (Baseggio i cols., 2010).

Cal destacar que en la nostra sèrie de LZME trobem que un perfil citogenètic diferent en funció de l'expressió de CD5. Els casos CD5+ presenten una major incidència de trisomia 3/3q, trisomia 18 i delecions a 6q, i una incidència menor de delecions a 7q com a única alteració citogenètica, en contrast amb el que descriu Baseggio i cols (2010). Per altra banda, els casos CD5- presenten una major incidència d'alteracions úniques al cariotip. No es va trobar associació entre l'expressió de CD5 i la presència al cariotip de trisomia 12, translocació de 14q32 o delecions del gen *TP53*. En contrast amb el que descriuen altres grups, que associen la expressió de CD5 amb la pèrdua del gen *TP53* (Boonstra i cols., 2003; Gimeno i cols., 2005), en aquest estudi no trobem associació entre els dos paràmetres.

No podem excloure formalment que alguns dels pacients CD5+ de la nostra sèrie siguin limfomes del mantell (LM) ciclina D1 negatiu, però l'absència generalitzada de limfadenopaties al diagnòstic i el curs clínic indolent estan en desacord amb el que ha estat descrit als LM ciclina D1 negatiu i argumenten en contra d'aquesta possibilitat

(Fernández i cols., 2010). A més, tots els casos CD5+ de la nostra sèrie van ser negatius per la t(11;14)(q13;q32), de tal manera que es descarta el diagnòstic de LM indolent (Mozos i cols., 2009).

Les diferències en el perfil citogenètic dels dos subgrups de LZME definits per l'expressió de CD5 és difícil de interpretar donada la relativa homogeneïtat d'ambdós subgrups respecte a gairebé tots els altres paràmetres clínic-biològics estudiats. Per tant, son necessaris estudis prospectius per confirmar aquestes troballes i explorar el seu potencial com a marcador de pronòstic.

1.3. Repertori d'ús de gens *IGHV* i estat mutacional

D'acord amb altres estudis previs (Stamatopoulos i cols., 2004; Ruiz Ballesteros i cols., 2005; Traverse-Glehen i cols., 2005; Bikos i cols., 2012) en aquesta sèrie observem un repertori d'ús de gens *IGHV* altament restringit, amb un ús esbiaixat del gen *IGHV1-2* (32% dels casos). Com a valor de tall per definir un cas com a mutat o no-mutat es va utilitzar el 98% de identitat amb la línia germinal. Així, els casos amb menys del 98% de identitat amb la línia germinal es van considerar mutats. Aquest valor és àmpliament utilitzat en la LLC per fer la distinció clínicament rellevant entre casos mutats i no mutats (Damle i cols., 1999; Hamblin i cols., 1999; Ghia i cols., 2007). Utilitzant aquest punt de tall, 59 de 100 (59%) seqüències analitzades a la nostra sèrie van ser definides com a mutades i la resta (41 de 100 seqüències; 41%) presentaven els gens *IGHV* no-mutats.

Les implicacions pronòstiques de l'estat mutacional del gen *IGHV* als LZME encara estan en discussió (Algara i cols., 2002; Traverse-Glehen i cols., 2005; Ruiz-Ballesteros i cols., 2005; Arcaini i cols., 2009; Kalpadakis i cols., 2009; Rinaldi i cols., 2010; Hockley i cols., 2012). Alguns estudis descriuen l'associació entre l'estat no-mutat de *IGHV* i un risc intermedi/alt segons el *score* del grup italià de limfomes (Arcaini i cols., 2009), la del(7q) (Algara i cols., 2002), un curs clínic advers (Algara i

cols., 2002; Novara i cols., 2009; Hockley i cols., 2012), delecions de 17p (Novara i cols., 2009) i una major complexitat genètica (Rinaldi i cols., 2010). D'acord amb estudis previs (Algara i cols., 2002) vam observar una associació entre la pèrdua de 7q i l'estat no-mutat de *IGHV*, però aquests paràmetres no van tenir impacte en la supervivència global. No obstant això, donat el caràcter retrospectiu i l'heterogeneïtat dels règims terapèutics al nostre estudi fan necessària una avaluació d'aquests paràmetres en un estudi prospectiu.

Curiosament, hem identificat una freqüència significativament més gran de del(7q) en els casos que presenten *IGHV1-2* en comparació amb la resta de gens *IGHV* (65.6% vs. 32.4%; $P=0.002$), independentment de l'estat mutacional. Aquest perfil citogenètic esbiaixat, reportat en aquest estudi per primera vegada, recorda a la situació que és dóna a la LLC, on diferents grups han descrit recentment troballes citogenètiques definides per l'ús preferent d'alguns gens *IGHV*. Per exemple, la del(13q) és freqüent en casos que expressen estereotips *IGHV4-34* (subgrup #4) (Stamatopoulos i cols., 2007; Athanasiadou i cols., 2009), i la t(14;19)(q32;q13) concurrent amb una trisomia 12 en casos que expressen estereotips *IGHV4-39* (subgrup #8) (Chacon i cols., 2002; Martín-Subero i cols., 2007; Athanasiadou i cols., 2009). Encara que els mecanismes patogènics subjacents son esquius i difícils de desxifrar, l'associació que identifiquem pot ser considerada com una evidència de l'evolució genètica dels diferents subgrups de LZME caracteritzats per presentar estructures distintives de receptors de cèl·lules B (RCB). Bikos i cols. (2012) suggereixen que aquestes característiques diferencials dels RCB podrien indicar la selecció per un element antigènic en la patogènesi del LZME, i que certs subtipus de LZME podrien derivar de poblacions de progenitors adaptats als desafiaments antigènics a través de la selecció d'especificitat del domini VH, en particular de l'al·lel *IGHV1-2*04*.

1.4. Pronòstic

EL LZME, en general, segueix un curs clínic indolent amb pacients que sobreviuen més de 10 anys, però alguns pacients presenten una malaltia més agressiva amb una supervivència entre 1 i 2 anys. El valor pronòstic dels paràmetres citogenètics i moleculars no està ben establert. Hi ha pocs estudis que incloguin un nombre elevat de pacients i alguns analitzen només paràmetres seleccionats (Gruzka-Westwood i cols., 2001; Algara i cols., 2002; Ruiz Ballesteros i cols., 2005; Hockley i cols., 2012; Kiel i cols., 2012). En aquest estudi s'inclou un número elevat de pacients diagnosticats de LZME per intentar avaluar les implicacions pronostiques de diversos paràmetres clínic-biològics, fent èmfasi especial en els perfils citogenètics.

Tenint en compte les variables clíniques, l'edat major de 65 anys, la Hb inferior a 12g/dL i la B2-microglobulina major de 3mg/L són variables que confereixen un mal pronòstic, d'acord amb estudis previs de Parry-Jones i cols. (2003) i Arcaini i cols. (2006). No es va poder confirmar el impacte pronòstic de la LDH i l'albumina, tal i com proposa el grup italià de limfomes (Arcaini i cols., 2006) i estudis més recents del grup d'estudi dels LZME-SMZLSG (Montalban i cols., 2012), probablement perquè el nombre de casos amb aquesta informació és relativament petit. La troballa que només paràmetres no específics de la malaltia (és a dir, l'edat i la Hb) mantinguin un significat pronòstic en l'anàlisi multivariant es podria interpretar com que la mort va ser el resultat de causes accidentals, almenys en una proporció de casos. Com a alternativa, els biomarcadors avaluats podrien ser predictius de la progressió però no de la resposta al tractament. Aquestes qüestions requereixen aclariment en estudis prospectius que incloguin un número elevat de pacients.

L'heterogeneïtat de les alteracions cromosòmiques i l'elevada incidència de cariotips complexos en el LZME obstaculitzen l'avaluació de l'impacte pronòstic de les alteracions individuals. No obstant això, les dades aquí presentades, indiquen que la

presència de 2 o més alteracions citogenètiques es correlaciona amb una supervivència més curta. Curiosament, els pacients amb un cariotip normal van mostrar un pronòstic intermedi. Aquests casos podrien presentar alteracions no detectades per bandes G/R o per FISH i el seu estudi mitjançant *microarrays* genòmics poden ser d'utilitat per detectar guanys o pèrdues amb major resolució.

Els nostres resultats no donen suport a resultats d'estudis previs on s'informa de el impacte pronòstic advers d'alteracions cromosòmiques com la del(7q) (Algara i cols., 2002) i/o associacions entre la trisomia 3, del(6q), del(7q), del(8p) i la trisomia 12 (Callet-Bauchu i cols., 2005). Per contra, proporcionem, per primera vegada, dades que suggereixen que les alteracions en 14q, especialment la pèrdua de 14q, pot marcar un pitjor pronòstic. No obstant això, atès que el nombre de casos amb pèrdua de 14q és petit, aquesta observació convindria que fos validada en sèries més amples de pacients amb aquesta alteració. A la majoria dels casos, l'alteració a 14q es va detectar en el context d'un cariotip complex, que per si sol ja presenta un pronòstic desfavorable.

1.5. Mutacions de *EZH2* (7q36.1) en el limfoma de la zona marginal esplènic (LZME)

En aquest estudi, es va analitzar l'estat mutacional del gen *EZH2* (*seqüència de referència NM 004456.3*) en una cohort de 29 pacients diagnosticats de LZME, 11 dels quals presentaven deleció de 7q, amb l'objectiu de descriure la incidència de mutacions de *EZH2*, no descrita prèviament en aquest subtipus de limfoma. El gen *EZH2* es localitza a 7q36.1, regió freqüentment alterada al LZME mitjançant estudis genòmics i podria tenir un paper en la patogènesi del LEZM afectant altres gens mitjançant mecanismes epigenètics. En el cas dels LBDCG s'han descrit mutacions que produeixen un guany de funció de *EZH2*, que mitjançant mecanismes epigenètics

actua reprimint la transcripció de gens i promou l'adquisició d'un patró d'expressió gènica de centre germinal (Yap i cols., 2011).

En primer lloc es van analitzar els pacients amb deleció de 7q, on es localitza el gen *EZH2*, (n=11; 3 amb 7q- com a única alteració) i després es va estendre l'estudi a LZME sense aquesta alteració (n=18; 11 cariotip normal i 7 amb altres alteracions citogenètiques). De tota la cohort de 29 pacients diagnosticats de LZME, no es van detectar mutacions patogèniques (mutacions sense sentit o amb canvi del pauta de lectura) en cap dels pacients analitzats. Cinc pacients van presentar una mutació sense sentit (D185H) a l'exó 6. Aquesta alteració ha estat descrita prèviament com un polimorfisme de nucleòtid únic a base de dades NCBI SNP (rs2302427). Dos d'aquets 5 casos presentaven una del(7q), dos casos un cariotip normal i un cas presentava altres alteracions citogenètiques, la qual cosa indica que no havia correlació entre la presència d'aquest SNP i l'alteració citogenètica.

Mitjançant estudis recents de ultraseqüenciació, s'ha observat que els LZME presenten una elevada complexitat genètica (25 mutacions per cas), major que a la tricoleucèmia o a la macroglobulinèmia de Walsdeström (MW) i menor que als LBDCG (Rossi i cols., 2012). Estudis de seqüenciació de tot el genoma i/o de l'exoma han demostrat que *NOTCH2* és el gen més freqüentment mutat als LZME (20% dels casos) i que, en circumstàncies normals, és essencial en la diferenciació del limfòcit B de la zona marginal. A més, les mutacions de *NOTCH2* son molt específiques del LZME, sent infreqüents en altres tipus de neoplàsies limfoproliferatives de cèl·lula B (LLC, LM, LF i LBDCG). També son freqüents les mutacions a gens de la via NF-κB (gen *IKBKB*; 7%). A més, sembla que les mutacions en aquesta via son mútuament excloents amb les mutacions de *NOTCH2*. També s'han descrit mutacions a *CARD11* (7%) i *MLL2* (15%), tot i que aquestes últimes son més freqüents a LBDCG i a LF. A la taula 9 es resumeixen les troballes més rellevants mitjançant tècniques de ultraseqüenciació.

Taula 9. Resum de les mutacions més freqüents al LZME observades mitjançant tècniques de seqüenciació massiva.

Mutacions somàtiques	Tècniques utilitzades	Altres alteracions genètiques	Implicacions clínicopatològiques	Estratègies terapèutiques
<i>NOTCH2</i> <i>MLL2</i> <i>TBL1XR1</i>	<i>Whole exome Sequencing</i> (Ross i cols., 2012) n=8	Delecions implicant: 7q31-32 17p13	-Via d'activació de NOTCH (<i>NOTCH2</i>)	Inhibició de la via NF-κB: -Inhibidor del proteosoma (e.x. <i>Bortezomib</i>)
<i>SIN3A</i> <i>EP300</i> <i>ARID1A</i> <i>CARD11</i> <i>BIRC3</i> <i>TNFAIP3</i> <i>IKBKB</i> <i>MYD88</i> <i>TP53</i>	<i>Whole genome sequencing</i> (Kiel i cols., 2012) n= 6	Guanys implicant 3q Alteracions de número de còpies no-recurrents	-Via d'activació de NF-κB (<i>MYD88</i> , <i>CARD11</i> , <i>IKBKB</i> , <i>TNFAIP3</i>) -Mutacions de <i>NOTCH2</i> Associades a mal pronòstic -Alteracions epigenètiques (<i>MLL2</i> , <i>TBL1XR1</i> , <i>SIN3A</i> , <i>EP300</i>)	Inhibició de la via de NOTCH Epigenètica: - Agents hipometilants (e.x. azacitidina) - HDACi (e.x. <i>panobinostat</i>)

5. CONCLUSIONS

1. La tècnica de citogenètica convencional amb bandes G en una sèrie llarga de pacients de LZME ha permès definir el perfil d'alteracions cromosòmiques d'aquesta malaltia. Les alteracions més freqüentment observades per ordre de freqüència van ser les pèrdues de 7q i 6q, els guanys de 3/3q i 12q i les translocacions que afecten 8q, 1q i 14q. Aquestes alteracions han estat descrites en altres series publicades prèviament a la literatura, la qual cosa confirmaria la existència d'un perfil genètic característic d'aquesta entitat.
2. Les translocacions que afecten la regió 14q32 presenten una baixa incidència (12%) al LZME, a diferència d'altres limfomes B. Per altre banda, la pèrdua de 14q és una alteració recurrent però molt poc freqüent (3%) al LZME.
3. S'ha definit un perfil citogenètic diferent en funció de l'expressió de l'anticòs CD5. Els casos CD5+ presenten una major incidència de trisomia 3/3q, trisomia 18 i delecions a 6q, i una incidència menor de delecions a 7q com a única alteració citogenètica. Per altra banda, els casos CD5- presenten una major incidència d'alteracions úniques al cariotip.
4. Respecte al repertori d'ús de gens *IGHV* al LZME, observem un ús esbiaixat de *IGHV1-2* associat a la delecio de 7q i independent de l'estat mutacional de *IGHV*. Aquesta associació podria ser considerada una evidència de l'existència de diferents subgrups citogenètics de LZME que presenten receptors RCB diferents, indicant una possible selecció antigènica al LZME.
5. S'ha observat una associació entre la pèrdua de 7q i l'estat no-mutat del gen *IGHV*, d'acord amb estudis previs, però aquests paràmetres no van tenir impacte en la supervivència global.

6. S'han observat alteracions genètiques i característiques clíniques que s'associen a un pitjor pronòstic:
 - 6.1. Respecte a les característiques clíniques, la edat superior a 65 anys, la Hb inferior a 12g/dL i la B2-microglobulina major a 3mg/L són variables que confereixen un mal pronòstic.
 - 6.2. Respecte a les alteracions citogenètiques, la presència de 2 ó més alteracions citogenètiques al cariotip es correlaciona amb una supervivència més curta. La elevada heterogeneïtat d'alteracions cromosòmiques i la elevada incidència de cariotips complexos dificulten l'avaluació del impacte pronòstic de les alteracions individuals.
 - 6.3. Les alteracions a 14q, especialment la pèrdua de 14q, semblen conferir mal pronòstic, tot i que són necessaris estudis amb un nombre més elevat de pacients amb aquesta alteració.

7. Respecte l'estat mutacional de *EZH2*, tot i que la deleció de 7q és una alteració recurrent al LZME, no s'han trobat mutacions del gen *EZH2* (localitzat a 7q36.1) en la nostra sèrie de LZME. Les mutacions de *EZH2* no jugarien un paper important en la patogènia d'aquesta entitat.

6. BIBLIOGRAFIA

- Algara P, Mateo MS, Sanchez-Beato M, Mollejo M, Navas IC, Romero L, Sole F, Salido M, Florensa L, Martinez P, et al. 2002. Analysis of the IgV(H) somatic mutations in splenic marginal zone lymphoma defines a group of unmutated cases with frequent 7q deletion and adverse clinical course. *Blood* 99(4):1299-304.
- Andersen CL, Gruszka-Westwood A, Ostergaard M, Koch J, Jacobsen E, Kjeldsen E, Nielsen B. 2004. A narrow deletion of 7q is common to HCL, and SMZL, but not CLL. *Eur J Haematol* 72(6):390-402.
- Andersen CL, Gruszka-Westwood A, Atkinson S, Matutes E, Catovsky D, Pedersen RK, Pedersen BB, Pulczynski S, Hokland P, Jacobsen E, et al. 2005. Recurrent genomic imbalances in B-cell splenic marginal-zone lymphoma revealed by comparative genomic hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 156(2):122-8.
- Arcaini L and Rossi D. 2012. Nuclear factor-kappaB dysregulation in splenic marginal zone lymphoma: New therapeutic opportunities. *Haematologica* 97(5):638-40.
- Arcaini L and Paulli M. 2010. Splenic marginal zone lymphoma: Hydra with many heads? *Haematologica* 95(4):534-7.
- Arcaini L, Zibellini S, Passamonti F, Rattotti S, Lucioni M, Invernizzi R, Merli M, Rizzi S, Boveri E, Rumi E, et al. 2009. Splenic marginal zone lymphoma: Clinical clustering of immunoglobulin heavy chain repertoires. *Blood Cells Mol Dis* 42(3):286-91.
- Arcaini L, Lazzarino M, Colombo N, Burcheri S, Boveri E, Paulli M, Morra E, Gambacorta M, Cortelazzo S, Tucci A, et al. 2006. Splenic marginal zone lymphoma: A prognostic model for clinical use. *Blood* 107(12):4643-9.
- Arribas AJ, Gomez-Abad C, Sanchez-Beato M, Martinez N, Dilisio L, Casado F, Cruz MA, Algara P, Piris MA, Mollejo M. 2013. Splenic marginal zone lymphoma: Comprehensive analysis of gene expression and miRNA profiling. *Mod Pathol* .
- Athanasiadou A, Stamatopoulos K, Gaitatzi M, Stavroyianni N, Fassas A, Anagnostopoulos A. 2008. Recurrent cytogenetic findings in subsets of patients with chronic lymphocytic leukemia expressing IgG-switched stereotyped immunoglobulins. *Haematologica* 93(3):473-4.
- Baro C, Salido M, Domingo A, Granada I, Colomo L, Serrano S, Sole F. 2006. Translocation t(9;14)(p13;q32) in cases of splenic marginal zone lymphoma. *Haematologica* 91(9):1289-91.
- Baro C, Salido M, Espinet B, Astier L, Domingo A, Granada I, Milla F, Carrio A, Costa D, Luno E, et al. 2008. New chromosomal alterations in a series of 23 splenic marginal zone lymphoma patients revealed by spectral karyotyping (SKY). *Leuk Res* 32(5):727-36.
- Baseggio L, Traverse-Glehen A, Petinataud F, Callet-Bauchu E, Berger F, Ffrench M, Couris CM, Thieblemont C, Morel D, Coiffier B, et al. 2010. CD5 expression identifies a subset of splenic marginal zone lymphomas with higher lymphocytosis: A clinico-pathological, cytogenetic and molecular study of 24 cases. *Haematologica* 95(4):604-12.

- Bea S and Campo E. 2008. Secondary genomic alterations in non-hodgkin's lymphomas: Tumor-specific profiles with impact on clinical behavior. *Haematologica* 93(5):641-5.
- Bea S, Colomo L, Lopez-Guillermo A, Salaverria I, Puig X, Pinyol M, Rives S, Montserrat E, Campo E. 2004. Clinicopathologic significance and prognostic value of chromosomal imbalances in diffuse large B-cell lymphomas. *J Clin Oncol* 22(17):3498-506.
- Bea S, Ribas M, Hernandez JM, Bosch F, Pinyol M, Hernandez L, Garcia JL, Flores T, Gonzalez M, Lopez-Guillermo A, et al. 1999. Increased number of chromosomal imbalances and high-level DNA amplifications in mantle cell lymphoma are associated with blastoid variants. *Blood* 93(12):4365-74.
- Bea S, Zettl A, Wright G, Salaverria I, Jehn P, Moreno V, Burek C, Ott G, Puig X, Yang L, et al. 2005. Diffuse large B-cell lymphoma subgroups have distinct genetic profiles that influence tumor biology and improve gene-expression-based survival prediction. *Blood* 106(9):3183-90.
- Bernicot I, Douet-Guilbert N, Le Bris MJ, Herry A, Morel F, De Braekeleer M. 2007. Molecular cytogenetics of IGH rearrangements in non-hodgkin B-cell lymphoma. *Cytogenet Genome Res* 118(2-4):345-52.
- Bikos V, Stalika E, Baliakas P, Darzentas N, Davis Z, Traverse-Glehen A, Dagklis A, Kanellis G, Anagnostopoulos A, Tsaftaris A, et al. 2012. Selection of antigen receptors in splenic marginal-zone lymphoma: Further support from the analysis of the immunoglobulin light-chain gene repertoire. *Leukemia* 26(12):2567-9.
- Boonstra R, Bosga-Bouwer A, van Imhoff GW, Krause V, Palmer M, Coupland RW, Dabbagh L, van den Berg E, van den Berg A, Poppema S. 2003. Splenic marginal zone lymphomas presenting with splenomegaly and typical immunophenotype are characterized by allelic loss in 7q31-32. *Mod Pathol* 16(12):1210-7.
- Brito-Babapulle V, Gruszka-Westwood AM, Platt G, Andersen CL, Elnenaei MO, Matutes E, Wotherspoon AC, Weston-Smith SG, Catovsky D. 2002. Translocation t(2;7)(p12;q21-22) with dysregulation of the CDK6 gene mapping to 7q21-22 in a non-hodgkin's lymphoma with leukemia. *Haematologica* 87(4):357-62.
- Brynes RK, Almaguer PD, Leathery KE, McCourty A, Arber DA, Medeiros LJ, Nathwani BN. 1996. Numerical cytogenetic abnormalities of chromosomes 3, 7, and 12 in marginal zone B-cell lymphomas. *Mod Pathol* 9(10):995-1000.
- Calin GA and Croce CM. 2006. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer* 6(11):857-66.
- Calin GA and Croce CM. 2006. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer* 6(11):857-66.
- Calin GA and Croce CM. 2006. MicroRNAs and chromosomal abnormalities in cancer cells. *Oncogene* 25(46):6202-10.

- Callet-Bauchu E, Baseggio L, Felman P, Traverse-Glehen A, Berger F, Morel D, Gazzo S, Poncet C, Thieblemont C, Coiffier B, et al. 2005. Cytogenetic analysis delineates a spectrum of chromosomal changes that can distinguish non-MALT marginal zone B-cell lymphomas among mature B-cell entities: A description of 103 cases. *Leukemia* 19(10):1818-23.
- Chacon JI, Mollejo M, Munoz E, Algara P, Mateo M, Lopez L, Andrade J, Carbonero IG, Martinez B, Piris MA, et al. 2002. Splenic marginal zone lymphoma: Clinical characteristics and prognostic factors in a series of 60 patients. *Blood* 100(5):1648-54.
- Chang CJ and Hung MC. 2012. The role of EZH2 in tumour progression. *Br J Cancer* 106(2):243-7.
- Chase A and Cross NC. 2011. Aberrations of EZH2 in cancer. *Clin Cancer Res* 17(9):2613-8.
- Chen Z, Morgan R, Berger CS, Sandberg AA. 1992. Application of fluorescence in situ hybridization in hematological disorders. *Cancer Genet Cytogenet* 63(1):62-9.
- Chiorazzi N, Rai KR, Ferrarini M. 2005. Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 352(8):804-15.
- Cooper GM and Jimeno Largo A. 2004. *La célula =The cell : A molecular approach*, 2^o ed. Madrid: Marbán Libros, S.L.
- Corcoran MM, Mould SJ, Orchard JA, Ibbotson RE, Chapman RM, Boright AP, Platt C, Tsui LC, Scherer SW, Oscier DG. 1999. Dysregulation of cyclin dependent kinase 6 expression in splenic marginal zone lymphoma through chromosome 7q translocations. *Oncogene* 18(46):6271-7.
- Damle RN, Wasil T, Fais F, Ghiotto F, Valetto A, Allen SL, Buchbinder A, Budman D, Dittmar K, Kolitz J, et al. 1999. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 94(6):1840-7.
- Delves PJ and Roitt IM. 2000. The immune system. first of two parts. *N Engl J Med* 343(1):37-49.
- Delves PJ and Roitt IM. 2000. The immune system. second of two parts. *N Engl J Med* 343(2):108-17.
- Dierlamm J, Pittaluga S, Wlodarska I, Stul M, Thomas J, Boogaerts M, Michaux L, Driessen A, Mecucci C, Cassiman JJ, et al. 1996. Marginal zone B-cell lymphomas of different sites share similar cytogenetic and morphologic features. *Blood* 87(1):299-307.
- Dierlamm J, Michaux L, Wlodarska I, Pittaluga S, Zeller W, Stul M, Criel A, Thomas J, Boogaerts M, Delaere P, et al. 1996. Trisomy 3 in marginal zone B-cell lymphoma: A study based on cytogenetic analysis and fluorescence in situ hybridization. *Br J Haematol* 93(1):242-9.

- Dierlamm J, Murga Penas EM, Bentink S, Wessendorf S, Berger H, Hummel M, Klapper W, Lenze D, Rosenwald A, Haralambieva E, et al. 2008. Gain of chromosome region 18q21 including the MALT1 gene is associated with the activated B-cell-like gene expression subtype and increased BCL2 gene dosage and protein expression in diffuse large B-cell lymphoma. *Haematologica* 93(5):688-96.
- Dungarwalla M, Appiah-Cubi S, Kulkarni S, Saso R, Wotherspoon A, Osuji N, Swansbury J, Cunningham DC, Catovsky D, Dearden CE, et al. 2008. High-grade transformation in splenic marginal zone lymphoma with circulating villous lymphocytes: The site of transformation influences response to therapy and prognosis. *Br J Haematol* 143(1):71-4.
- Duong Van Huyen JP, Molina T, Delmer A, Audouin J, Le Tourneau A, Zittoun R, Bernadou A, Diebold J. 2000. Splenic marginal zone lymphoma with or without plasmacytic differentiation. *Am J Surg Pathol* 24(12):1581-92.
- Ernst T, Chase AJ, Score J, Hidalgo-Curtis CE, Bryant C, Jones AV, Waghorn K, Zoi K, Ross FM, Reiter A, et al. 2010. Inactivating mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myeloid disorders. *Nat Genet* 42(8):722-6.
- Espinete B, Salaverria I, Bea S, Ruiz-Xiville N, Balague O, Salido M, Costa D, Carreras J, Rodriguez-Vicente AE, Luis Garcia J, et al. 2010. Incidence and prognostic impact of secondary cytogenetic aberrations in a series of 145 patients with mantle cell lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer* 49(5):439-51.
- Fernandez V, Salamero O, Espinete B, Sole F, Royo C, Navarro A, Camacho F, Bea S, Hartmann E, Amador V, et al. 2010. Genomic and gene expression profiling defines indolent forms of mantle cell lymphoma. *Cancer Res* 70(4):1408-18.
- Franco V, Florena AM, Iannitto E. 2003. Splenic marginal zone lymphoma. *Blood* 101(7):2464-72.
- Franco V, Florena AM, Campesi G. 1996. Intrasinusoidal bone marrow infiltration: A possible hallmark of splenic lymphoma. *Histopathology* 29(6):571-5.
- Fu K, Weisenburger DD, Greiner TC, Dave S, Wright G, Rosenwald A, Chiorazzi M, Iqbal J, Gesk S, Siebert R, et al. 2005. Cyclin D1-negative mantle cell lymphoma: A clinicopathologic study based on gene expression profiling. *Blood* 106(13):4315-21.
- Gazzo S, Baseggio L, Coignet L, Poncet C, Morel D, Coiffier B, Felman P, Berger F, Salles G, Callet-Bauchu E. 2003. Cytogenetic and molecular delineation of a region of chromosome 3q commonly gained in marginal zone B-cell lymphoma. *Haematologica* 88(1):31-8.
- Ghia P, Stamatopoulos K, Belessi C, Moreno C, Stilgenbauer S, Stevenson F, Davi F, Rosenquist R, European Research Initiative on CLL. 2007. ERIC recommendations on IGHV gene mutational status analysis in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 21(1):1-3.

- Giannouli S, Paterakis G, Ziakas PD, Anagnostou D, Voulgarelis M. 2004. Splenic marginal zone lymphomas with peripheral CD5 expression. *Haematologica* 89(1):113-4.
- Gimeno E, Salido M, Sole F, Florensa L, Granada I, Domingo A, Woessner S. 2005. CD5 negative and CD5 positive splenic marginal B-cell lymphomas have differential cytogenetic patterns. *Leuk Res* 29(8):981-2.
- Gruszka-Westwood AM, Hamoudi R, Osborne L, Matutes E, Catovsky D. 2003. Deletion mapping on the long arm of chromosome 7 in splenic lymphoma with villous lymphocytes. *Genes Chromosomes Cancer* 36(1):57-69.
- Gruszka-Westwood AM, Hamoudi RA, Matutes E, Tuset E, Catovsky D. 2001. P53 abnormalities in splenic lymphoma with villous lymphocytes. *Blood* 97(11):3552-8.
- Gruszka-Westwood AM, Matutes E, Coignet LJ, Wotherspoon A, Catovsky D. 1999. The incidence of trisomy 3 in splenic lymphoma with villous lymphocytes: A study by FISH. *Br J Haematol* 104(3):600-4.
- Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK. 1999. Unmutated ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 94(6):1848-54.
- Harper ME and Saunders GF. 1981. Localization of single copy DNA sequences of G-banded human chromosomes by in situ hybridization. *Chromosoma* 83(3):431-9.
- Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J, Lister TA, Bloomfield CD. 1999. World health organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: Report of the clinical advisory committee meeting-airlie house, virginia, november 1997. *J Clin Oncol* 17(12):3835-49.
- Harris NL, Jaffe ES, Stein H, Banks PM, Chan JK, Cleary ML, Delsol G, De Wolf-Peeters C, Falini B, Gatter KC. 1994. A revised european-american classification of lymphoid neoplasms: A proposal from the international lymphoma study group. *Blood* 84(5):1361-92.
- Heim S and Mitelman F. 2009. *Cancer cytogenetics*. 3rd ed. Hoboken, N.J.: Wiley-Blackwell.
- Hernandez JM, Schoenmakers EF, Dal Cin P, Michaux L, Van de Ven WJ, Van den Berghe H. 1997. Molecular delineation of the commonly deleted segment in mature B-cell lymphoid neoplasias with deletion of 7q. *Genes Chromosomes Cancer* 18(2):147-50.
- Hernandez JM, Garcia JL, Gutierrez NC, Mollejo M, Martinez-Climent JA, Flores T, Gonzalez MB, Piris MA, San Miguel JF. 2001. Novel genomic imbalances in B-cell splenic marginal zone lymphomas revealed by comparative genomic hybridization and cytogenetics. *Am J Pathol* 158(5):1843-50.

- Hockley SL, Else M, Morilla A, Wotherspoon A, Dearden C, Catovsky D, Gonzalez D, Matutes E. 2012. The prognostic impact of clinical and molecular features in hairy cell leukaemia variant and splenic marginal zone lymphoma. *Br J Haematol* .
- Huh YO, Abruzzo LV, Rassidakis GZ, Parry-Jones N, Schlette E, Brito-Bapabulle V, Matutes E, Wotherspoon A, Keating MJ, Medeiros LJ, et al. 2007. The t(14;19)(q32;q13)-positive small B-cell leukaemia: A clinicopathologic and cytogenetic study of seven cases. *Br J Haematol* 136(2):220-8.
- International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature, Shaffer LG, Tommerup N. 2005. ISCN 2005 : An international system for human cytogenetic nomenclature (2005) : Recommendations of the international standing committee on human cytogenetic nomenclature. Basel ; Farmington, CT: Karger.
- International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature, Shaffer LG, Slovak ML, Campbell LJ. 2009. ISCN an international system for human cytogenic nomenclature (2009). Basel: Karger.
- Jaffe ES. 2001. Pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: International Agency for Research on Cancer.
- Jardin F, Jais JP, Molina TJ, Parmentier F, Picquenot JM, Ruminy P, Tilly H, Bastard C, Salles GA, Feugier P, et al. 2010. Diffuse large B-cell lymphomas with CDKN2A deletion have a distinct gene expression signature and a poor prognosis under R-CHOP treatment: A GELA study. *Blood* 116(7):1092-104.
- Jares P, Colomer D, Campo E. 2007. Genetic and molecular pathogenesis of mantle cell lymphoma: Perspectives for new targeted therapeutics. *Nat Rev Cancer* 7(10):750-62.
- Jerez A, Sugimoto Y, Makishima H, Verma A, Jankowska AM, Przychodzen B, Visconte V, Tiu RV, O'Keefe CL, Mohamedali AM, et al. 2012. Loss of heterozygosity in 7q myeloid disorders: Clinical associations and genomic pathogenesis. *Blood* .
- Johansson B, Mertens F, Mitelman F. 1995. Cytogenetic evolution patterns in non-hodgkin's lymphoma. *Blood* 86(10):3905-14.
- Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D. 1992. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 258(5083):818-21.
- Kalpadakis C, Pangalis GA, Dimitriadou E, Angelopoulou MK, Siakantaris MP, Kyrtsolis MC, Ximeris M, Tzenou T, Sahanas S, Yiakoumis X, et al. 2009. Mutation analysis of IgVH genes in splenic marginal zone lymphomas: Correlation with clinical characteristics and outcome. *Anticancer Res* 29(5):1811-6.
- Kiel MJ, Velusamy T, Betz BL, Zhao L, Weigelin HG, Chiang MY, Huebner-Chan DR, Bailey NG, Yang DT, Bhagat G, et al. 2012. Whole-genome sequencing identifies recurrent somatic NOTCH2 mutations in splenic marginal zone lymphoma. *J Exp Med* 209(9):1553-65.

- Kuppers R, Klein U, Hansmann ML, Rajewsky K. 1999. Cellular origin of human B-cell lymphomas. *N Engl J Med* 341(20):1520-9.
- Lohr JG, Stojanov P, Lawrence MS, Auclair D, Chapuy B, Sougnez C, Cruz-Gordillo P, Knoechel B, Asmann YW, Slager SL, et al. 2012. Discovery and prioritization of somatic mutations in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) by whole-exome sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(10):3879-84.
- Makishima H, Jankowska AM, Tiu RV, Szpurka H, Sugimoto Y, Hu Z, Saunthararajah Y, Guinta K, Keddache MA, Putnam P, et al. 2010. Novel homo- and hemizygous mutations in EZH2 in myeloid malignancies. *Leukemia* 24(10):1799-804.
- Martinez-Climent JA, Fontan L, Gascoyne RD, Siebert R, Prosper F. 2010. Lymphoma stem cells: Enough evidence to support their existence? *Haematologica* 95(2):293-302.
- Martinez-Climent JA, Sanchez-Izquierdo D, Sarsotti E, Blesa D, Benet I, Climent J, Vizcarra E, Marugan I, Terol MJ, Sole F, et al. 2003. Genomic abnormalities acquired in the blastic transformation of splenic marginal zone B-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma* 44(3):459-64.
- Martin-Subero JI, Gesk S, Harder L, Grote W, Siebert R. 2003. Interphase cytogenetics of hematological neoplasms under the perspective of the novel WHO classification. *Anticancer Res* 23(2A):1139-48.
- Martin-Subero JI, Ibbotson R, Klapper W, Michaux L, Callet-Bauchu E, Berger F, Calasanz MJ, De Wolf-Peeters C, Dyer MJ, Felman P, et al. 2007. A comprehensive genetic and histopathologic analysis identifies two subgroups of B-cell malignancies carrying a t(14;19)(q32;q13) or variant BCL3-translocation. *Leukemia* 21(7):1532-44.
- Mateo M, Mollejo M, Villuendas R, Algara P, Sanchez-Beato M, Martinez P, Piris MA. 1999. 7q31-32 allelic loss is a frequent finding in splenic marginal zone lymphoma. *Am J Pathol* 154(5):1583-9.
- Matutes E. 2009. Clinical and biological diversity of splenic marginal zone lymphoma. *Expert Rev Anticancer Ther* 9(9):1185-9.
- Matutes E, Morilla R, Owusu-Ankomah K, Houlihan A, Catovsky D. 1994. The immunophenotype of splenic lymphoma with villous lymphocytes and its relevance to the differential diagnosis with other B-cell disorders. *Blood* 83(6):1558-62.
- Matutes E, Oscier D, Montalban C, Berger F, Callet-Bauchu E, Dogan A, Felman P, Franco V, Iannitto E, Mollejo M, et al. 2008. Splenic marginal zone lymphoma proposals for a revision of diagnostic, staging and therapeutic criteria. *Leukemia* 22(3):487-95.
- McCabe MT, Graves AP, Ganji G, Diaz E, Halsey WS, Jiang Y, Smitheman KN, Ott HM, Pappalardi MB, Allen KE, et al. 2012. Mutation of A677 in histone methyltransferase EZH2 in human B-cell lymphoma promotes hypertrimethylation of histone H3 on lysine 27 (H3K27). *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(8):2989-94.

- Melo JV, Hegde U, Parreira A, Thompson I, Lampert IA, Catovsky D. 1987. Splenic B cell lymphoma with circulating villous lymphocytes: Differential diagnosis of B cell leukaemias with large spleens. *J Clin Pathol* 40(6):642-51.
- Michaux L, Dierlamm J, Wlodarska I, Bours V, Van den Berghe H, Hagemeijer A. 1997. t(14;19)/BCL3 rearrangements in lymphoproliferative disorders: A review of 23 cases. *Cancer Genet Cytogenet* 94(1):36-43.
- Mollejo M, Rodriguez-Pinilla MS, Montes-Moreno S, Algara P, Dogan A, Cigudosa JC, Juarez R, Flores T, Forteza J, Arribas A, et al. 2009. Splenic follicular lymphoma: Clinicopathologic characteristics of a series of 32 cases. *Am J Surg Pathol* 33(5):730-8.
- Montalban C, Abraira V, Arcaini L, Domingo-Domenech E, Guisado-Vasco P, Iannito E, Mollejo M, Matutes E, Ferreri A, Salar A, et al. 2012. Risk stratification for splenic marginal zone lymphoma based on haemoglobin concentration, platelet count, high lactate dehydrogenase level and extrahilar lymphadenopathy: Development and validation on 593 cases. *Br J Haematol* 159(2):164-71.
- Morin RD, Johnson NA, Severson TM, Mungall AJ, An J, Goya R, Paul JE, Boyle M, Woolcock BW, Kuchenbauer F, et al. 2010. Somatic mutations altering EZH2 (Tyr641) in follicular and diffuse large B-cell lymphomas of germinal-center origin. *Nat Genet* 42(2):181-5.
- Mozos A, Royo C, Hartmann E, De Jong D, Baro C, Valera A, Fu K, Weisenburger DD, Delabie J, Chuang SS, et al. 2009. SOX11 expression is highly specific for mantle cell lymphoma and identifies the cyclin D1-negative subtype. *Haematologica* 94(11):1555-62.
- Muller S, Rocchi M, Ferguson-Smith MA, Wienberg J. 1997. Toward a multicolor chromosome bar code for the entire human karyotype by fluorescence in situ hybridization. *Hum Genet* 100(2):271-8.
- Murray F, Darzentas N, Hadzidimitriou A, Tobin G, Boudjogra M, Scielzo C, Laoutaris N, Karlsson K, Baran-Marzsak F, Tsiftaris A, et al. 2008. Stereotyped patterns of somatic hypermutation in subsets of patients with chronic lymphocytic leukemia: Implications for the role of antigen selection in leukemogenesis. *Blood* 111(3):1524-33.
- Nikoloski G, Langemeijer SM, Kuiper RP, Knops R, Massop M, Tonnissen ER, van der Heijden A, Scheele TN, Vandenberghe P, de Witte T, et al. 2010. Somatic mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myelodysplastic syndromes. *Nat Genet* 42(8):665-7.
- Novara F, Arcaini L, Merli M, Passamonti F, Zibellini S, Rizzi S, Rattotti S, Rumi E, Pascutto C, Vetro A, et al. 2009. High-resolution genome-wide array comparative genomic hybridization in splenic marginal zone B-cell lymphoma. *Hum Pathol* .
- Oscier DG, Gardiner A, Mould S. 1996. Structural abnormalities of chromosome 7q in chronic lymphoproliferative disorders. *Cancer Genet Cytogenet* 92(1):24-7.

- Oscier DG, Matutes E, Gardiner A, Glide S, Mould S, Brito-Babapulle V, Ellis J, Catovsky D. 1993. Cytogenetic studies in splenic lymphoma with villous lymphocytes. *Br J Haematol* 85(3):487-91.
- Papadaki T, Stamatopoulos K, Belessi C, Pouliou E, Parasi A, Douka V, Laoutaris N, Fassas A, Anagnostopoulos A, Anagnostou D. 2007. Splenic marginal-zone lymphoma: One or more entities? A histologic, immunohistochemical, and molecular study of 42 cases. *Am J Surg Pathol* 31(3):438-46.
- Pardue ML and Gall JG. 1969. Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 64(2):600-4.
- Parry-Jones N, Matutes E, Gruszka-Westwood AM, Swansbury GJ, Wotherspoon AC, Catovsky D. 2003. Prognostic features of splenic lymphoma with villous lymphocytes: A report on 129 patients. *Br J Haematol* 120(5):759-64.
- Peveling-Oberhag J, Crisman G, Schmidt A, Doring C, Lucioni M, Arcaini L, Rattotti S, Hartmann S, Piiper A, Hofmann WP, et al. 2012. Dysregulation of global microRNA expression in splenic marginal zone lymphoma and influence of chronic hepatitis C virus infection. *Leukemia* .
- Pillai S and Cariappa A. 2009. The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision. *Nat Rev Immunol* 9(11):767-77.
- Pospisilova H, Baens M, Michaux L, Stul M, Van Hummelen P, Van Loo P, Vermeesch J, Jarosova M, Zemanova Z, Michalova K, et al. 2007. Interstitial del(14)(q) involving IGH: A novel recurrent aberration in B-NHL. *Leukemia* 21(9):2079-83.
- Quintanilla-Martinez L, Slotta-Huspenina J, Koch I, Klier M, Hsi ED, de Leval L, Klapper W, Gesk S, Siebert R, Fend F. 2009. Differential diagnosis of cyclin D2+ mantle cell lymphoma based on fluorescence in situ hybridization and quantitative real-time-PCR. *Haematologica* 94(11):1595-8.
- Remstein ED, Law M, Mollejo M, Piris MA, Kurtin PJ, Dogan A. 2008. The prevalence of IG translocations and 7q32 deletions in splenic marginal zone lymphoma. *Leukemia* 22(6):1268-72.
- Rinaldi A, Mian M, Chigrinova E, Arcaini L, Bhagat G, Novak U, Rancoita PM, De Campos CP, Forconi F, Gascoyne RD, et al. 2011. Genome-wide DNA profiling of marginal zone lymphomas identifies subtype-specific lesions with an impact on the clinical outcome. *Blood* 117(5):1595-604.
- Robledo C, Garcia JL, Benito R, Flores T, Mollejo M, Martinez-Climent JA, Garcia E, Gutierrez NC, Piris MA, Hernandez JM. 2011. Molecular characterization of the region 7q22.1 in splenic marginal zone lymphomas. *PLoS One* 6(9):e24939.
- Rossi D, Deaglio S, Dominguez-Sola D, Rasi S, Vaisitti T, Agostinelli C, Spina V, Bruscaggini A, Monti S, Cerri M, et al. 2011. Alteration of BIRC3 and multiple other NF-kappaB pathway genes in splenic marginal zone lymphoma. *Blood* 118(18):4930-4.

- Ruiz-Ballesteros E, Mollejo M, Rodriguez A, Camacho FI, Algara P, Martinez N, Pollan M, Sanchez-Aguilera A, Menarguez J, Campo E, et al. 2005. Splenic marginal zone lymphoma: Proposal of new diagnostic and prognostic markers identified after tissue and cDNA microarray analysis. *Blood* 106(5):1831-8.
- Ryan RJ, Nitta M, Borger D, Zukerberg LR, Ferry JA, Harris NL, Iafrate AJ, Bernstein BE, Sohani AR, Le LP. 2011. EZH2 codon 641 mutations are common in BCL2-rearranged germinal center B cell lymphomas. *PLoS One* 6(12):e28585.
- Salaverria I, Zettl A, Bea S, Moreno V, Valls J, Hartmann E, Ott G, Wright G, Lopez-Guillermo A, Chan WC, et al. 2007. Specific secondary genetic alterations in mantle cell lymphoma provide prognostic information independent of the gene expression-based proliferation signature. *J Clin Oncol* 25(10):1216-22.
- Salido M, Astier L, Puigdecenet E, Espinet B, Florensa L, Sole F. 2003. Absence of ATM deletions in 16 cases of splenic marginal-zone B-cell lymphoma (SMZBCL). *Haematologica* 88(11):ELT33.
- Sauvageau M and Sauvageau G. 2010. Polycomb group proteins: Multi-faceted regulators of somatic stem cells and cancer. *Cell Stem Cell* 7(3):299-313.
- Schlegelberger B, Gohring G, Thol F, Heuser M. 2012. Update on cytogenetic and molecular changes in myelodysplastic syndromes. *Leuk Lymphoma* 53(4):525-36.
- Schmid C, Kirkham N, Diss T, Isaacson PG. 1992. Splenic marginal zone cell lymphoma. *Am J Surg Pathol* 16(5):455-66.
- Schrock E, du Manoir S, Veldman T, Schoell B, Wienberg J, Ferguson-Smith MA, Ning Y, Ledbetter DH, Bar-Am I, Soenksen D, et al. 1996. Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. *Science* 273(5274):494-7.
- Seto M. 2004. Genetic and epigenetic factors involved in B-cell lymphomagenesis. *Cancer Sci* 95(9):704-10.
- Sole F, Espinet B, Salido M, Lloveras E, Fernandez C, Cigudosa JC, Asensio A, Woessner S, Florensa L. 2000. Translocation t(6;14)(p12;q32): A novel cytogenetic abnormality in splenic lymphoma with villous lymphocytes. *Br J Haematol* 110(1):241-3.
- Sole F, Salido M, Espinet B, Garcia JL, Martinez Climent JA, Granada I, Hernandez JM, Benet I, Piris MA, Mollejo M, et al. 2001. Splenic marginal zone B-cell lymphomas: Two cytogenetic subtypes, one with gain of 3q and the other with loss of 7q. *Haematologica* 86(1):71-7.
- Sonoki T, Harder L, Horsman DE, Karran L, Taniguchi I, Willis TG, Gesk S, Steinemann D, Zucca E, Schlegelberger B, et al. 2001. Cyclin D3 is a target gene of t(6;14)(p21.1;q32.3) of mature B-cell malignancies. *Blood* 98(9):2837-44.
- Speicher MR, Gwyn Ballard S, Ward DC. 1996. Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nat Genet* 12(4):368-75.

- Stamatopoulos K, Belessi C, Papadaki T, Kalagiakou E, Stavroyianni N, Douka V, Afendaki S, Saloum R, Parasi A, Anagnostou D, et al. 2004. Immunoglobulin heavy- and light-chain repertoire in splenic marginal zone lymphoma. *Mol Med* 10(7-12):89-95.
- Stamatopoulos K, Belessi C, Moreno C, Boudjograh M, Guida G, Smilevska T, Belhou L, Stella S, Stavroyianni N, Crespo M, et al. 2007. Over 20% of patients with chronic lymphocytic leukemia carry stereotyped receptors: Pathogenetic implications and clinical correlations. *Blood* 109(1):259-70.
- Sternberg SS. 1997. *Histology for pathologists*. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven.
- Su IH, Basavaraj A, Krutchinsky AN, Hobert O, Ullrich A, Chait BT, Tarakhovsky A. 2003. Ezh2 controls B cell development through histone H3 methylation and igh rearrangement. *Nat Immunol* 4(2):124-31.
- Sumner AT, de la Torre J, Stuppia L. 1993. The distribution of genes on chromosomes: A cytological approach. *J Mol Evol* 37(2):117-22.
- Swerdlow SH, Organización Internacional para la Investigación del Cáncer, Organización Mundial de la Salud. 2008. *WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues*. 4th ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer.
- Thieblemont C, Nasser V, Felman P, Leroy K, Gazzo S, Callet-Bauchu E, Loriod B, Granjeaud S, Gaulard P, Haioun C, et al. 2004. Small lymphocytic lymphoma, marginal zone B-cell lymphoma, and mantle cell lymphoma exhibit distinct gene-expression profiles allowing molecular diagnosis. *Blood* 103(7):2727-37.
- Traverse-Glehen A, Davi F, Ben Simon E, Callet-Bauchu E, Felman P, Baseggio L, Gazzo S, Thieblemont C, Charlot C, Coiffier B, et al. 2005. Analysis of VH genes in marginal zone lymphoma reveals marked heterogeneity between splenic and nodal tumors and suggests the existence of clonal selection. *Haematologica* 90(4):470-8.
- Troussard X, Mauvieux L, Radford-Weiss I, Rack K, Valensi F, Garand R, Vekemans M, Flandrin G, Macintyre EA. 1998. Genetic analysis of splenic lymphoma with villous lymphocytes: A groupe francais d'hematologie cellulaire (GFHC) study. *Br J Haematol* 101(4):712-21.
- Troussard X, Valensi F, Duchayne E, Garand R, Felman P, Tulliez M, Henry-Amar M, Bryon PA, Flandrin G. 1996. Splenic lymphoma with villous lymphocytes: Clinical presentation, biology and prognostic factors in a series of 100 patients. groupe francais d'hematologie cellulaire (GFHC). *Br J Haematol* 93(3):731-6.
- Vega F, Cho-Vega JH, Lennon PA, Luthra MG, Bailey J, Breeden M, Jones D, Medeiros LJ, Luthra R. 2008. Splenic marginal zone lymphomas are characterized by loss of interstitial regions of chromosome 7q, 7q31.32 and 7q36.2 that include the protection of telomere 1 (POT1) and sonic hedgehog (SHH) genes. *Br J Haematol* .

- Ventura RA, Martin-Subero JI, Jones M, McParland J, Gesk S, Mason DY, Siebert R. 2006. FISH analysis for the detection of lymphoma-associated chromosomal abnormalities in routine paraffin-embedded tissue. *J Mol Diagn* 8(2):141-51.
- Viardot A, Moller P, Hogel J, Werner K, Mechttersheimer G, Ho AD, Ott G, Barth TF, Siebert R, Gesk S, et al. 2002. Clinicopathologic correlations of genomic gains and losses in follicular lymphoma. *J Clin Oncol* 20(23):4523-30.
- Watkins AJ, Huang Y, Ye H, Chanudet E, Johnson N, Hamoudi R, Liu H, Dong G, Attygalle A, McPhail ED, et al. 2010. Splenic marginal zone lymphoma: Characterization of 7q deletion and its value in diagnosis. *J Pathol* 220(4):461-74.
- Wheater PR, Burkitt HG, Daniels VG, Deakin PJ, Garfia González A, Ribas Mujal D, Wheeler PR. 1996. *Histología funcional [de] wheater : Texto y atlas en color. 1a , 4a reimp ed. Barcelona etc.: Jims.*
- Wlodarska I, Dierickx D, Vanhentenrijk V, Van Roosbroeck K, Pospisilova H, Minnei F, Verhoef G, Thomas J, Vandenberghe P, De Wolf-Peeters C. 2008. Translocations targeting CCND2, CCND3, and MYCN do occur in t(11;14)-negative mantle cell lymphomas. *Blood* 111(12):5683-90.
- Woessner S and Florensa Brichs L. 2006. *La citología óptica en el diagnóstico hematológico. 5{487} ed. Madrid: Accion Médica.*
- Yap DB, Chu J, Berg T, Schapira M, Cheng SW, Moradian A, Morin RD, Mungall AJ, Meissner B, Boyle M, et al. 2011. Somatic mutations at EZH2 Y641 act dominantly through a mechanism of selectively altered PRC2 catalytic activity, to increase H3K27 trimethylation. *Blood* 117(8):2451-9.
- Zenz T, Dohner H, Stilgenbauer S. 2007. Genetics and risk-stratified approach to therapy in chronic lymphocytic leukemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 20(3):439-53.

7. ANNEXOS

7.1. ANNEX 1. MATERIAL I MÈTODES

SELECCIÓ DE PACIENTS

En aquests treball s'han utilitzat mostres de diferents tipus de teixits biològics dels següents grups de malalts amb un diagnòstic de limfoma esplènic de la zona marginal (LEZM):

- **Article 1.** 330 pacients procedents de diferents centres europeus que pertanyen al “*Splenic B-cell lymphoma Group*”:
 - Complejo Hospitalario de Toledo. Espanya.
 - Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO). Madrid. Espanya.
 - Departamento de Genética. Facultad de Ciencias. Universidad de Navarra. Pamplona. Espanya.
 - Hospital del Mar. Barcelona. Espanya.
 - Hospital Germans Trias i Pujol. Badalona. Espanya.
 - Hospital Universitario Central de Asturias. Oviedo. Espanya.
 - Hospital Royal Bournemouth, Anglaterra.
 - Institute of Cancer Research. Londres, Anglaterra.
 - Hospital Papanicolaou, Thessaloniki, Grècia.
 - Hospital Evangelismos, Atenes, Grècia.
 - Hospital Hamburg-Eppendorf, Hamburgo, Alemanya.
 - Hospices Civils de Lyon, Centre Hospitalier Lyon Sud, Pierre-Bénite, França.
 - Hôpital Saint-Louis, Paris, França.
 - Institute of Human Genetics. University Hospital Schleswig-Holstein. Kiel. Alemanya
 - Center for Human Genetics, Catholic University Leuven, Leuven, Bèlgica.
 - University Hospital Gasthuisberg, Leuven, Bèlgica.

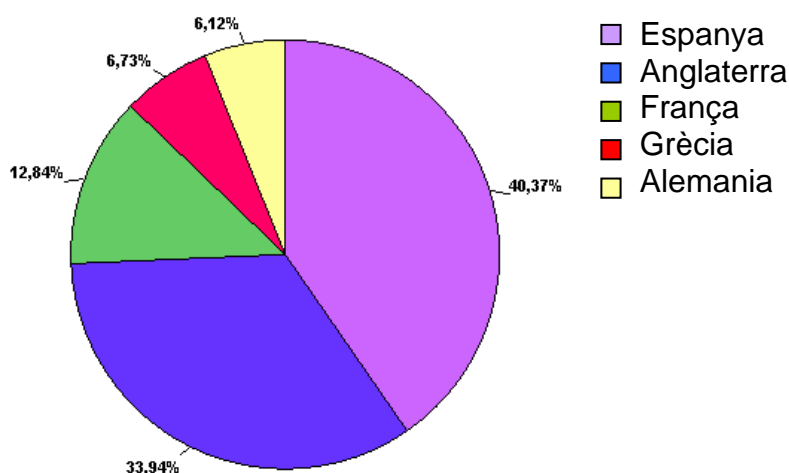


Figura1. Percentatge de malalts amb un LEZM recollits segons la seva procedència

- **Article 2.** Vint-i-nou pacients procedents de l'Hospital del Mar. La selecció d'aquests malalts es va realitzar en funció del cariotip: 11 pacients presentaven deleció de la regió 7q, 11 presentaven un cariotip normal i 7 presentaven altres alteracions citogenètiques diferents de la deleció de 7q.

En ambdós estudis, el diagnòstic de LEZM es va establir segons la classificació de la WHO 2008, i pels casos no-esplenectomitzats, seguint les guies publicades per "*Splenic B-cell lymphoma Group*" basades en la combinació de dades clíniques, morfològiques, l'immunofenotip, citogenètica i la histologia de medul·la òssia.

TÈCNIQUES DE CITOGENÈTICA CONVENCIONAL

Extracció i conservació de les mostres

Les mostres utilitzades per a l'estudi citogenètic han estat de quatre tipus: sang perifèrica, medul·la òssia, gangli limfàtic i melsa. Tot seguit es descriu com s'ha realitzat la seva extracció i conservació:

A. Mostres de sang perifèrica

La sang perifèrica s'obté de la vena basilica o mitjana cefàlica del braç. S'extreuen de 2 a 5 ml de sang perifèrica en condicions estèrils. La sang es recull en un tub estèril que conté 0.1 ml d'heparina sòdica o heparina de liti, però mai amb EDTA, ja que inhibeix el creixement cel·lular.

Si no es possible posar a créixer el cultiu el mateix dia de l'extracció, es recomana guardar en nevera (2-4°C) un màxim de 2-3 dies.

B. Mostres de medul·la òssia

La medul·la òssia s'obté per punció d'aspiració, habitualment a nivell esternal o bé de l'espina ilíaca postero-superior. Després d'anestesiàr la zona, s'efectua la punció, es penetra a la cavitat medul·lar amb un tròcar i es procedeix a aspirar uns 2 ml de medul·la òssia. La primera fracció de la medul·la òssia que s'aspira és la més rica en cèl·lules en divisió, però a mesura que l'extracció continua, la mostra es contamina amb sang medul·lar. Per aquesta raó, és aconsellable utilitzar la primera fracció per al cultiu cel·lular.

La mostra de medul·la òssia es recull en un tub de centrífuga amb 5ml de medi RPMI-1640 i heparina sòdica o de liti a l'1%.

La mostra de medul·la òssia s'ha de posar a cultivar tan aviat com sigui possible després de la seva extracció per obtenir el màxim de metafases. En el cas que la mostra s'hagi de transportar o guardar, es recomanable fer-ho a T^a ambient o bé a 37°C un màxim de 10 hores.

C. Mostres de gangli limfàtic i melsa

L'extracció del gangli limfàtic o la melsa es realitza per un mètode quirúrgic dut a terme per un cirurgià. La peça es recull de quiròfan en una gasa estèril i es porta en sec al laboratori d'anatomia patològica. Allà es seleccionarà la porció que s'enviarà al laboratori de citogenètica. Es recomanable processar-lo tot seguit a l'extracció, ja que l'eficiència del cultiu disminueix a mida que el temps després de l'extracció augmenta.

Reactius

- Medi RPMI-1640 (Biological Industries)
- Antibiòtics, Penicil·lina (10.000 Unitats/ml), Estreptomina (10 mg/ml unitats) (Biological Industries)
- L-Glutamina 200mm (Biological Industries)
- Heparina sòdica 1% (Rovi)
- Mitògens, Fitohemaglutinina (PHA) (Gibco BRL), Phorbol-12- Myristate 13-Acetate (TPA) (Sigma)
- Sèrum boví fetal (Biological Industries)
- Colcemid 10µg/ml (Gibco BRL)

Solucions

- Hipotònic:
 - Clorur potàssic (KCl) 0.075M (Merck)
- Fixador:
 - Carnoy:
 - - 3 parts de Metanol (Merck)
 - 1 part d'àcid acètic glacial (Merck)
- Composició del medi de cultiu:
 - 75% RPMI-1640
 - 21% Sèrum boví fetal
 - 2% L-glutamina
 - 1% Heparina sòdica
 - 1% Penicil·lina-Estreptomina

Es fan alíquotes de 10 ml del medi complet en falcons de cultiu de plàstic estèril de 25 cc. Es poden conservar a -20°C fins al moment del seu ús.

Procediment**Tècnica de citogenètica convencional en cultius de sang perifèrica****A. Manipulació del medi de cultiu i de la mostra**

- Quan la mostra arriba al laboratori, s'ha de fer el recompte del número total de leucòcits amb un comptador automàtic. Un cop s'hagi obtingut la xifra de leucòcits

es calcularà el volum de sang necessari pel cultiu de forma que la concentració quedi ajustada a 2×10^6 cèl/ml.

- Deixar descongelar un flascó amb 10 ml de medi de cultiu complert, prèviament preparat, a temperatura ambient o al bany maria a 37°C.

Afegir la quantitat necessària de mitògen. En el present treball s'ha fet servir com a mitògen per tal d'estimular els limfòcits B el TPA. Afegir 0.1 ml.

- Afegir la quantitat de mostra ajustada a 2×10^6 cèl/ml.

B. Cultiu

- Col·locar el flascó en una estufa a 37°C al 5% de CO₂ deixant el tap una mica obert. Cultivar durant 72-120 hores barrejant el cultiu per inversió un cop cada dia.

C. Extracció del cultiu

- Per analitzar el major número de metafases, s'afegeixen 100 µl d'antimitòtic (Colcemid) dues hores abans d'extreure el cultiu, i es deixa actuar dins de l'estufa a 37°C.
- Abocar el contingut del flascó dins un tub cònic de plàstic estèril i centrifugar la mostra durant 7-8 minuts a 1800 r.p.m.
- Decantar i descartar el sobrenedant amb cura de no perdre el botó cel·lular.
- Resuspendre el sediment cel·lular.
- Afegir solució hipotònica (hipotònic) de KCl (0.075 M) pre-escalfada a 37°C. Afegir gota a gota i agitant fins als 2 primers ml per evitar que el xoc de l'hipotònic sigui molt bruscat, i després a raig fins a 8-10 ml.
- Deixar actuar l'hipotònic 20 minuts al bany maria a 37°C.
- Centrifugar 7-8 minuts a 1800 r.p.m.
- Descartar el sobrenedant i resuspendre el botó cel·lular.
- Afegir fixador Carnoy (3 parts de metanol i una d'àcid acètic) per lisar els hematies i eliminar les restes de citoplasma. Primer afegir gota a gota i agitant fins a 2 ml i després a raig fins a 8-10 ml.
- Centrifugar 7-8 minuts a 1800 r.p.m.
- Repetir el procés de fixació 3-5 vegades fins que el sobrenedant sigui transparent i el sediment cel·lular blanc.
- En l'últim rentat, decantar i resuspendre el botó amb unes gotes de fixador.
- Fer 4-6 extensions per mostra. Es fan servir portaobjectes netejats amb metanol fred. Agafar una pipeta Pasteur i tirar 2 gotes des de mig metre d'alçada aproximadament sobre un portaobjectes. D'aquesta manera obtindrem metafases més escampades.

-
- Assecar les extensions en una planxa a 45°C, i deixar-les envellir en una planxa a 100°C durant 1 hora.

Tècnica de citogenètica convencional en cultius de medul·la òssia

A. Manipulació del medi cultiu i de la mostra

- Descongelar un flascó amb 10 ml de medi de cultiu complert, prèviament preparat, a temperatura ambient o al bany maria a 37°C.
- Centrifugar la mostra de medul·la òssia durant 8 minuts a 1500 r.p.m. S'extreu la capa blanca (rica en cèl·lules mononucleades, entre les quals hi ha els limfòcits que ens interessa estudiar) amb una pipeta Pasteur estèril. Depenent de la cel·lularitat de la mostra s'afegiran de 0.3 a 0.8 ml de la cap blanca per ajustar el cultiu a 2×10^6 cèl/ml.
- Afegir la quantitat necessària de mitògen. En el present treball s'ha fet servir com a mitògen per tal d'estimular els limfòcits B el TPA. Afegir 0.1 ml.

B. Cultiu

- Col·locar el flascó en una estufa a 37°C al 5% de CO₂ deixant el tap una mica obert.
- El temps de cultiu dependrà del tipus de cèl·lules que predominin a la suspensió cel·lular:
 - Cultiu de 24h, si les cèl·lules son immadures
 - Cultiu de 72-120 hores si les cèl·lules son madures

C. Processat de la mostra

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

Tècnica de citogenètica convencional en cultius de gangli limfàtic i melsa

A. Obtenció de la suspensió cel·lular

- Abans de d'iniciar la disgregació del teixit ganglionar o de la melsa, es talla una part (1.5x1.5x0.5cm) que s'utilitza per fer improntes. La tinció d'aquestes improntes amb *May-Grünwald* Giemsa ens permet observar la morfologia de les cèl·lules obtingudes i orientar el tipus de cultiu a realitzar (curt o llarg).
- La resta de la peça s'utilitza per obtenir la suspensió cel·lular. Es col·loca sobre una càpsula de petri estèril amb 2ml de medi RPMI-1640 complementat amb heparina sòdica a l'1%.

-
- Es procedeix a punxar la peça repetides vegades amb l'ajuda d'una pinça i una xeringa de 5ml estèrils. En aquest procés s'afavoreix que les cèl.lules del gangli o la melsa surtin pels forats que hem practicat a la superfície de la peça.
 - Quan el medi està prou tèrbol, indicatiu la presència de cel·lularitat al medi, s'atura la disgregació mecànica.
 - La suspensió cel·lular es recull amb una pipeta Pasteur estèril i es col·loca en un tub de plàstic de 10ml estèril.
 - Centrifugar durant 7-8 min a 1500 r.p.m
 - Descartar sobrenedant i resuspendre el pellet cel·lular
 - Comptatge cel·lular amb la càmera de *Neubauer*

B. Cultiu

- Afegir la suspensió cel·lular ajustada a 2×10^6 cel/ml a 10ml de medi de cultiu. Col·locar el flascó en una estufa a 37°C al 5% de CO₂ deixant el tap una mica obert.
- El temps de cultiu dependrà del tipus de cèl.lules que predominin a la suspensió cel·lular:
 - Cultiu de 24h, si les cèl.lules son immadures. Sense mitògen
 - Cultiu de 72-120 hores si les cèl.lules B son madures. Afegir 0.1 ml de TPA.

C. Processat de la mostra

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

Tècniques de bandeig cromosòmic (bandes G)

Reactius

- Tampó Sørensen pH 6.8:
 - 4,539 mg/ml fosfat mono potàssic 0.06M, (Merck)
 - 5,938 mg/ml fosfat sòdic di hidratat 0.06 M, (Merck)
- Colorant: colorant de *Wright*, (Sigma)
 - Es prepara una solució al 0.25% de colorant de *Wright* en metanol (Merck).
 - S'agita la barreja 1 hora en una ampolla preservada de la llum.
 - Filtrar amb un paper de filtre.

Es guarda a 37°C durant 72 hores. Un cop preparat es conserva a 4°C.

Procediment

Després de deixar envellir les preparacions 1 hora en una planxa a 100°C, es tenyeix amb la tinció de *Wright* durant 2-5 minuts. Per realitzar la tinció, es barregen 3 parts de tampó amb 1 part de colorant. Per cada portaobjectes es fan servir 3 ml de tampó y 1 ml de colorant. La barreja es prepara al moment de realitzar la tinció i no es reutilitza.

Anàlisi microscòpica i nomenclatura

S'han estudiat un mínim de 20 metafases per cas al microscopi òptic, amb l'objectiu de x100 d'immersió. De les 20 metafases, cal cariotipar un mínim de 5 i comptar les restants. Per cariotipar s'ha utilitzat el sistema d'anàlisi d'imatges digital *Cytovision* (Applied Imaging).

Les anomalies s'han descrit seguint la nomenclatura ISCN 2009. Es considera que una alteració és clonal quan la mateixa alteració estructural o guany d'un cromosoma es troba com a mínim en dues metafases o, en cas de ser una pèrdua, es troba en com a mínim en tres metafases.

En aquests treballs es van tenir les següents consideracions:

- Cariotip complex: qualsevol cariotip que presenta ≥ 3 alteracions o presenta dos o més clons.
- "Dos alteracions": Pacients que presenten dos alteracions al mateix clon o dos clons citogenèticament independents amb un únic canvi citogenètic.
- "Alteració única": Una única alteració al cariotip, numèrica o estructural (també cromosomes derivatius i translocacions).

TÈCNiques D'HIBRIDACIÓ IN SITU FLUORESCENT (FISH)

Mostres analitzades

Les mostres utilitzades per realitzar la tècnica de hibridació in situ fluorescent (FISH, de l'anglès *fluorescence in situ hybridization*) procedien de mostres processades per citogenètica convencional emmagatzemades amb solució fixadora (Carnoy) a una temperatura de -20°C a -80°C . El període d'emmagatzematge de les mostres abans de realitzar la tècnica de FISH va ser variable, de pocs dies fins a 5-6 anys.

Metodologia de la tècnica de FISH. Sondes centromèriques i de locus específic

El protocol que s'utilitza segueix les recomanacions que dona la comercial Abbott Molecular o DAKO a les quals pertanyen les sondes emprades en aquest estudi.

Reactius

Formamida (Merck)

20XSSC

Etanol (Merck)

Igepal (NP40) (Sigma)

DAPI II (DAPI+*Antifade*) (Abbott Molecular)

Solucions

- Solució de 20XSSC:

- 88.23 mg/ml citrat trisòdic dihidratat (Merck)
- 175.32 mg/ml clorur sòdic (Merck)

Ajustar pH a 6.2-6.3 amb HCL 2N. Conservar a temperatura ambient

- Solució de formamida al 70% (per una cubeta):

- 70 ml de Formamida
- 10 ml de solució de 20XSSC
- 20 ml d'aigua destil·lada

Ajustar el pH a 7.5 ± 0.05 amb HCL 2N. Conservar un màxim de 2 setmanes a nevera.

- Solució de formamida al 50% (per tres cubetes):

- 125 ml de Formamida
- 25 ml de solució de 20xSSC
- 100 ml d'aigua destil·lada

Ajustar el pH a 7 ± 0.05 amb HCL 2N. Conservar un màxim de 2 setmanes a nevera.

- Solució de 2xSSC: 100 ml de 20xSSC i 900 ml d'aigua destil·lada

- Solució 2xSSC/0.1% NP40: 499.5 ml de 2xSSC + 0.5 ml de NP40

Procediment

Preparació de la mostra

Es important fer una extensió del material procedent de la citogenètica rica en nuclis i ben secada:

- Es realitzen les extensions sobre portaobjectes prèviament desengreixats amb metanol fred
- S'envelleixen les preparacions deixant-les tota la nit a temperatura ambient

Desnaturalització de l'ADN de les mostres i de les sondes

La desnaturalització de l'ADN és el procés pel qual la doble hèlix d'àcid nucleic se separa en dues cadenes senzilles i s'aplica tant a l'ADN de la sonda com a l'ADN de la mostra a estudiar.

Prèviament es prepara la solució desnaturalitzant de formamida al 70% i es col·loquen les solucions de deshidratació i desnaturalització a la temperatura adequada:

- a) 1 Cubeta de Formamida al 70% pH 7.5 Bany a 74°C
 - b) 1 Cubeta de Etanol al 70%Temp. Ambient
 - c) 2 Cubetes de Etanol al 85%Temp. Ambient
 - d) 1 Cubeta de Etanol al 100%Temp. Ambient
- Centrifugar (pols) els tubs de sonda per tenir-la tota al fons
 - Encendre la planxa a 45-50°C i col·locar-hi una cambra humida
 - Desnaturalització de la sonda:
 - Barrejar 3.5 µL de tampó d'hibridació + 0.5 µL de sonda + 1µL de aigua destil·lada a temperatura ambient dins d'un eppendorf estèril tapat amb paper de plata per evitar el contacte amb la llum
 - Centrifugar la barreja de 1 a 3 segons
 - Desnaturalitzar durant 5 minuts a 74°C al bany (comprovar temperatura amb termòmetre)
 - Tornar a centrifugar la barreja
 - Desnaturalització de la mostra:
 - Desnaturalitzar la mostra en la solució de formamida al 70% durant 5 minuts a 74°C
 - Deshidratar en una sèrie d'etanol al 70%, 85% i 100% durant un minut a temperatura ambient
 - Assecar la mostra per sota i deixar-la dreta perquè regalimi tot el líquid

-
- Deixar eixugar a l'aire com a mínim 30 minuts fins el moment de la hibridació
 - Col·locar els 5µL de la barreja de la sonda, prèviament desnaturalitzada, sobre la mostra
 - Cobrir amb un cobreobjectes net de 20x20 mm i segellar amb cola

Reacció d'hibridació

Col·locar el portaobjectes amb la sonda sobre la mostra a la cambra humida pre-escalfada i incubar a 37°C tota la nit (12-24 hores) o col·locar a l'hibridador (*Hybrite*) durant 12 hores

Durant aquest procés es produeix la unió específica per complementarietat de bases de la sonda amb l'ADN complementari a la mostra

Rentats de post-hibridació

Prèviament es preparen les solucions de rentat:

- 3 cubetes de formamida al 50%.....bany 45°C
- Una cubeta de 2xSSC.....bany 45°C
- Un cubeta de 2xSSC/0.1% NP-40.....bany 45°C
- Deixar temperar al bany a 45°C durant 30 minuts
- Treure la cola de segellat dels cobreobjectes
- Col·locar el portaobjectes dins el primer bany de formamida al 50%. Agitar amb les ajuda de les pinces per tal que els cobreobjectes es desenganxin i caiguin al primer cubeta de formamida
- Fer tres rentats en una solució de formamida al 50% durant 10 minuts a 45°C cada un
- Fer un rentat en una solució de 2xSSC durant 10 minuts a 45°C
- Fer un rentat en una solució de 2xSSC/0.1%NP-40 durant 5 minuts a 45°C
- Deixar assecar a la foscor

Els rentats de post-hibridació permeten eliminar l'excés de sonda que no ha hibridat i també dissociar els híbrids no perfectes que s'hagin pogut formar entre regions amb una elevada homologia.

Contratinció

- Col·locar 8-10 µL de DAPI II (DAPI + *Antifade*) a l'àrea diana i un cobreobjectes a sobre. No segellar amb laca d'ungles. Assecar l'excés de DAPI II amb un paper absorbent fins que el cobreobjectes no es mogui
- Mantenir les preparacions a -20°C en una caixa fosca

El DAPI és un fluorocrom que s'uneix de forma inespecífica a tot l'ADN i ens permet visualitzar els nuclis i les metafases d'un color blau intens, amb els filtres adequats.

Observació al microscopi de fluorescència i obtenció de imatges de FISH

Per l'observació de metafases híbrides amb les diferents sondes emprades s'ha fet servir un microscopi òptic amb dispositiu d'epifluorescència (Olympus BX61). S'han utilitzat els objectius de x10 per rastrejar i un objectiu de x100 per analitzar els resultats. S'han utilitzat els filtres pels següents fluorocroms: *Spectrum Orange* o *Spectrum Red*, *Spectrum Green* i DAPI amb els que estan marcades les sondes. Per la captura de imatges de FISH s'ha fet servir un sistema d'anàlisi d'imatges digital *Cytovision* (Applied Imaging).

Sondes utilitzades en aquets estudis

La tècnica de hibridació in situ fluorescent (FISH) es va utilitzar per descriure alteracions genètiques/cromosòmiques no trobades al cariotip convencional. Es van utilitzar sondes comercials (Abbott Molecular i DAKO) per la detecció de les principals alteracions genètiques als LEZM. El llistat de sondes utilitzades es detalla en la taula 1.

Taula 1. Sondes utilitzades a l'article 1.

Sonda	Cromosoma/Banda	Gens
CEP3// BCL6 (BAP)	#3/3q26	<i>BCL6</i>
LSI 7q31/CEP7	7q31	--
MYC (BAP or DFP)	8q24	<i>MYC</i>
PAX5 (BAP)	9p13	<i>PAX5</i>
LSI ATM	11q23	<i>ATM</i>
CEP12	12	--
LSI 13q14	13q14	<i>RB</i>
14q32 (BAP)	14q32	<i>IGH</i>
LSI P53	17p13	<i>TP53</i>

Abreviatures: CEP: Sonda centromèrica específica; BAP: sonda de trencament o *Break-Apart*; LSI: Sonda específica de locus; DFP: Sonda de doble fusió.

TÈCNICA DE “CROSS-SPECIES COLOR BANDING FISH” (RxFISH)

Tipus de mostres

Aquesta tècnica s'ha realitzat sobre mostres que procedien de la tècnica de citogenètica convencional fixades amb una solució de Carnoy. Les mostres es mantenen emmagatzemades amb solució fixadora de Carnoy a -20°C .

Reactius

Formamida (Merck)

20XSSC

Etanol (Merck)

Igepal (NP40) (Sigma)

Tween-20 (Sigma)

DAPI *counterstain* (Sigma)

Citifluor (*Sigma*)

DAPI II (DAPI+*Antifade*) (Abbott Molecular)

Solucions

- Solució de 20XSSC:

- 88.23 mg/ml citrat trisòdic dihidratat (Merck)
- 175.32 mg/ml clorur sòdic (Merck)

Ajustar pH a 6.2-6.3 amb HCL 2N. Conservar a temperatura ambient.

- Solució de formamida al 70% (per una cubeta):

- 70 ml de Formamida
- 10 ml de solució de 20XSSC
- 20 ml d'aigua destil·lada

Ajustar el pH a 7.5 ± 0.05 amb HCL 2N. Conservar un màxim de 2 setmanes a nevera.

- Solució de formamida al 50% (per dues cubetes):

- 50 ml de Formamida
- 25 ml de solució de 20xSSC
- 25 ml d'aigua destil·lada

Ajustar el pH a 7 ± 0.05 amb HCL 2N. Conservar un màxim de 2 setmanes a nevera.

- Solució de 2xSSC: 100 ml de 20xSSC i 900 ml d'aigua destil·lada

Conservar a 4°C .

- Solució de 4XT:

- 4xSSC: 100mL de 20xSSC i 400 ml d'aigua destil·lada

- Tween-20 al 0.05%:0.25 ml de Tween-20
Conservar a 4°C.
- Solució mare (stock) de DAPI (10 µg/ml):
 - 100 ml de 2xSSC
 - 1.0 mg de DAPI
- Solució de treball de DAPI (0.1 µg/ml):
 - 500 µL de la solució mare (stock)
 - 50 ml de 2xSSC

Procediment

Preparació de la mostra

Es important que la preparació sigui rica en metafases, amb poc citoplasma i amb els cromosomes ben estesos i de bona qualitat.

- Es realitzen les extensions sobre portaobjectes prèviament desengreixats amb metanol fred.
- S'envelleixen les preparacions depenent de si la hibridació la realitzem el mateix dia o al dia següent:
 - a) El mateix dia: Es deixen les preparacions 2h a 60°C a l'estufa de dessecació o 1h a 100°C
 - b) Al dia següent: -Es deixen les preparacions tota la nit a temperatura ambient.
-Es deixen 1h a 65°C en una estufa de dessecació.

Desnaturalització i Hibridació:

Prèviament es prepara la solució desnaturalitzant de formamida al 70% i es col·loquen les solucions de deshidratació i desnaturalització a la temperatura adequada:

- e) 1 Cubeta de Formamida al 70% pH 7.5 Bany a 72°C.
 - f) 1 Cubeta de Etanol al 70%.....Congelador de -20 a 0 °C.
 - g) 1 Cubeta de Etanol al 70%Temp. ambient.
 - d) 2 Cubetes de Etanol al 90%Temp. ambient.
 - e) 1 Cubeta de Etanol al 100%Temp. ambient.
- Es transfereixen 8-10 µl de la sonda de RxFISH a un tub eppendorf protegit de la llum. La sonda de RxFISH ve diluïda amb un tampó d'hibridació que permet la desnaturalització de la sonda i la posterior hibridació sobre la mostra.

- Desnaturalització de la sonda de RxFISH: S'incuba el tub eppendorf amb els 8-10 µl de sonda RxFISH a un bany a 65°C durant 10 minuts.

Posteriorment, es manté l'eppendorf a un bany a 37°C com a mínim 10 minuts i no més de dues hores (aproximadament 30 minuts).

- Deshidratació i desnaturalització del portaobjectes:

Abans de fer la desnaturalització de la mostra, realitzem un pas previ de deshidratació per afavorir la obertura de la doble cadena del ADN. Per fer-ho submergim les preparacions en etanol al 100% durant 5 minuts. Desnaturalització:

- a) Es desnaturalitza el portaobjectes en la formamida al 70%, pre-escalfada a 72°C, durant 1 minut i 30 segons.
- b) Immediatament després, es col·loca el portaobjectes en etanol al 70% fred (-20 a 0°C) durant 2 minuts.
- c) Es deshidrata el portaobjectes fent servir una sèrie de etanols:
 - Etanol 70% 2 minuts.
 - Etanol 90% 2 minuts.
 - Etanol 90% 2 minuts.
 - Etanol 100% 2 minuts.
- d) Deixem assecar la mostra a temperatura ambient.

- Reacció d'hibridació:

Es col·loquen 8-10µl de la sonda de RxFISH desnaturalitzada que tenim al bany a 37°C sobre la mostra, es cobreix amb un cobreobjectes i el segellem amb cola. Deixem incubant les mostres tota la nit a una cambra humida a 37°C evitant que els hi toqui la llum, ja que aquestes sondes estan marcades directament amb fluorescència.

Rentats de Post-hibridació

Es realitza un rentat d'hibridació amb 2XSSC per fer caure el cobreobjectes. Després fem dos rentats amb formamida al 50%, dos més amb 2XSSC i un rentat amb 4XT per eliminar l'excés de sonda que no s'ha unit específicament a l'ADN.

Per fer la contra tinció de l'ADN :

1. A les primeres mostres : Es prepara el DAPI *counterstain*. Es col·loca el portaobjectes en el Cubeta de DAPI *counterstain* durant 2 minuts per contra tenir la mostra. Un cop passats els dos minuts col·loquem a sobre un cobreobjectes amb 25 µl de *citifluor* (medi de muntatge). Guardem la preparació a -20°C durant un mínim de 20 minuts per augmentar la senyal fluorescent.

-
2. Actualment: La contratinció es realitza directament afegint 10 µl de DAPI II *counsterstain* (DAPI + *antifade*) i cobrint amb un cobreobjectes.

Anàlisi al microscopi de fluorescència i obtenció d'imatges de RxFISH

Per l'observació de metafases hibridades amb la sonda de RxFISH hem fet servir un microscopi òptic amb dispositiu d'epifluorescència NIKON Eclipse 600. S'han utilitzat els objectius de x50 per rastrejar les metafases i un objectiu de x100 per analitzar-les. S'ha instal·lat una roda de filtres automàtica amb filtres pels següents fluorocroms: Cianina 32 (CY3), Cianina 52 (CY5) i *Streptavidin-fluorescein isothiocyanate* (FITC) amb els que està marcada la sonda de RxFISH. Un cop localitzem una metafase es capturen els 3 fluorocroms per separat més el DAPI (contratinció). Per integrar les 4 imatges i obtenir la composició en color fem servir un sistema d'anàlisi d'imatges digital *Cytovision* (Applied Imaging).

Si la mostra ho permet, es realitza el cariotipat de 20 metafases per mostra. Les anomalies s'han descrit seguint la nomenclatura ISCN (2009).

Establiment dels nivells de tall per a la determinació de certesa d'existència d'alteracions cromosòmiques

Es molt difícil establir uns nivells de tall per aquest tipus de sondes, ja que es valoren unes alteracions estructurals específiques en cada cas, que pot ser que no es repeteixin en els altres casos. Així doncs, en el nostre cas vàrem posar a punt la tècnica en el laboratori utilitzant controls sans (cultiu de sang perifèrica amb PHA) i vàrem validar el bon funcionament d'aquesta. S'ha considerat un resultat com a positiu quan una alteració estructural concreta s'ha confirmat com a mínim en dues metafases del mateix individu.

ANÀLISI MUTACIONAL PER SEQÜENCIACIÓ DIRECTA

L'anàlisi mutacional de la seqüència codificant del gen *EZH2* (NM_1127208.2) es va realitzar mitjançant seqüenciació directa a partir de l'ADN extret de limfòcits B purificats de sang perifèrica o de limfòcits totals si el percentatge de limfòcits B patològics a la mostra era superior al 50%.

Extracció de l'ADN

La extracció de l'ADN es va realitzar de manera automatitzada amb la estació de treball Biorobot M48 de *Qiagen* que fa servir una tecnologia de separació magnètica d'àcids nucleics (Figura 2).



Figura 2. Estació de treball Biorobot M48 de Qiagen.

Tècnica de PCR

La reacció de PCR es va realitzar a partir de 100ng d'ADN en un volum final de 50µl, al qual es van afegir: 5 µl de tampó 10x, 4 µl de 25mM MgCl₂, 5 µl de dNTPs 2mM, 4 µl de cada primer (10µM), 26.75 µl H₂O i 0.25 µl de polimerasa (TaqGold).

Les mostres van ser amplificades després d'un cicle de 10 minuts a 95°C per l'activació de la polimerasa, 40 cicles d'amplificació [95°C durant 1 minut (desnaturalització), 62°C durant 1 minut (hibridació dels oligonucleòtids), 72°C durant 1 minut (elongació)] i 1 cicle final de 10 minuts a 72°C. Els resultats es van comprovar migrant els productes de la PCR en un gel d'agarosa al 0'8-1% tenyit amb bromur d'etidi. A la Taula 2 es detalla la seqüència dels primers utilitzats.

Taula 2. Llistat de primers utilitzats per la seqüenciació del gen *EZH2*.

Amplicó	Seqüència del primer directe (5'-3')	Seqüència del primer revers (5'-3')
<i>EZH2</i> NM_1127208.2	CAGGAAACAGCTATGACCCA CTGATTGTTAGTTTGCTGCG GA	TGTA AACGACGGCCAGT CGATTGCCATCCTTTCTTT GTTGA
<i>EZH2</i> PCR1	CAGGAAACAGCTATGACCG GATGGCAATCGTTTCCTGTT C	TGTA AACGACGGCCAGTC CTGAGGTCAATGATTTCT CCC
<i>EZH2</i> PCR2	AGGAAACAGCTATGACCTGA TGGCTACAGCTTAAGGTTGT CCT	TGTA AACGACGGCCAGTT GCCATATTGCCAGGTGGA
<i>EZH2</i> PCR3	CAGGAAACAGCTATGACCTC TCAGATATGCTTATTGGTGA GAGGG	TGTA AACGACGGCCAGTG GGCCAGGTTCAAGTCCCTT
<i>EZH2</i> PCR4	CAGGAAACAGCTATGACCG GAGGAGGCCAAAGCCACAA A	TGTA AACGACGGCCAGTA GCCACCCTACCTGGCCATA A
<i>EZH2</i> PCR5	CAGGAAACAGCTATGACCTT GACTGACTGGCATTCCACAG A	TGTA AACGACGGCCAGTG GCTCATCCGCTACATTGAT TCC
<i>EZH2</i> PCR6	CAGGAAACAGCTATGACCCA CCATGCACAATATTTAGTTG GCTC	TGTA AACGACGGCCAGTT TCAGAGCAATCCTCAAGCA ACAA
<i>EZH2</i> PCR7	CAGGAAACAGCTATGACCTG GTTGGAGGAGGAGGAATGG	TGTA AACGACGGCCAGTT GGAAGAAACAGCATGGGT GAGA
<i>EZH2</i> PCR8	CAGGAAACAGCTATGACCG GTAGTCTGACTCCGTGCACA TTAGG	TGTA AACGACGGCCAGTG CTAGGGTACGGGTGCAGG C
<i>EZH2</i> PCR9	CAGGAAACAGCTATGACCGC CGATTGGATTTGAGTTGTCC	TGTA AACGACGGCCAGTT CATTCAATTCCTCTTGGG AAGAA
<i>EZH2</i> PCR10	CAGGAAACAGCTATGACCTC TTCCAAGAGGGAATTGAAT GAA	TGTA AACGACGGCCAGTA GAAACCAACAACAGCCCTT AGGAA
<i>EZH2</i> PCR11	CAGGAAACAGCTATGACCGA CGTCTTGCCACACCTGGG	TGTA AACGACGGCCAGTG GGATTCATCAGTAGACGTC CTCCA
<i>EZH2</i> PCR12	CAGGAAACAGCTATGACCCC ATCGTTGTGGAAACCGGA	TGTA AACGACGGCCAGTG ACACACAACACCCAGGCCGA
<i>EZH2</i> PCR13	CAGGAAACAGCTATGACCCC AGTACAGCCCTTGCCACG	TGTA AACGACGGCCAGTG CCAAGGGTGCATTACCCA
<i>EZH2</i> PCR14	CAGGAAACAGCTATGACCTG CAGCAGGCCTAGAGCACC	TGTA AACGACGGCCAGTG CATGCAAATCCACAAACAT GC
<i>EZH2</i> PCR15	CAGGAAACAGCTATGACCTA CTGCGCAGACCGAATGGG	TGTA AACGACGGCCAGTA CCCACAGACAGCCGGGAC T
<i>EZH2</i> PCR15	CAGGAAACAGCTATGACCTG CCTATTCGTGATGTTTGGAA GA	TGTA AACGACGGCCAGTC AACAGCAGGGTGAGAAATG GG

EZH2 PCR16	CAGGAAACAGCTATGACCTG TGCCGTTATGCAGGCAGC	TGTAAAACGACGGCCAGTT TTGTTGAGCAGTCCTGAAA GCAG
-------------------	--	--

Seqüenciació

La PCR de seqüenciació que s'ha fet servir és la *BigDye Terminator v3.1 cycle sequencing kit* (Applied Biosystems) seguint les instruccions de la casa comercial. A la reacció de seqüenciació s'afegeixen: 1 µl del producte de PCR a seqüenciar (prèviament purificat en plaques de purificació Millipore), 1µl del mix de seqüenciació, 6.18 µl H₂O, 1.5 µl de tampó i 0.32 µl de cebador (directe o revers). Els cebadors o *primers* utilitzats per la seqüenciació van ser els primers universals M13. L'amplificació de PCR utilitzada va ser de 25 cicles (96°C durant 10", 50°C durant 5", 60°C durant 4') prèvia desnaturalització de 3' a 94°C.

Els productes de la PCR de seqüenciació es van analitzar al seqüenciador automàtic 3500 Dx Genetic analyzer (Applied Biosystems). Els arxius de les seqüències es van analitzar utilitzant el programa SeqScape (Applied Biosystems).

Anàlisi estadístics

L'associació entre les dades genètiques i les clíniques es va realitzar utilitzant els test de *Chi cuadrado* i el test de significança estadística de *Fisher* depenent del tamany de la mostra analitzada. L'anàlisi de les taules de supervivència es va realitzar mitjançant el mètode de *Kaplan-Meier* i la comparació de les corbes de supervivència entre els diferents grups de pacients mitjançant el test de *log-rank* (anàlisi univariat). La supervivència global de cada pacient (OS, *overall survival*) es va calcular des de la data de diagnòstic a la data de mort (per qualsevol causa) o últim control de seguiment de la malaltia. Per l'anàlisi multivariat es va utilitzar la Regressió de Cox. Només es van incloure aquells pacients amb totes les dades (n=140/330). A l'anàlisi multivariat es van incloure els paràmetres que a l'anàlisi univariat van ser estadísticament significatius. El valor $p \leq 0.05$ va ser considerat estadísticament significatiu. Tots els anàlisi es van realitzar amb el paquet estadístic SPSS v.15 (SPSS Inc, Chicago, IL, EEUU). Les comparacions realitzades i les dades de supervivència es descriuen a l'article 1.

TABLE S1. List of DNA probes used for FISH analyses in a series of 330 SMZL.

Probe	Chromosome/Band	Gene	Number of Cases analyzed
CEP3// BCL6 (BAP)	#3/3q26	<i>BCL6</i>	129
LSI 7q31/CEP7	7q31	--	5
MYC (BAP or DFTP)	8q24	<i>MYC</i>	5
PAX5 (BAP)	9p13	<i>PAX5</i>	3
LSI ATM	11q23	<i>ATM</i>	16
CEP12	12	--	36
LSI 13q14	13q14	<i>RB</i>	10
14q32 (BAP)	14q32	<i>IGH</i>	61
LSI P53	17p13	<i>TP53</i>	155

Abbreviations: CEP: Centromeric probe; BAP: Break-Apart; LSI: Locus specific probe; DFTP: dual fusion translocation probe.

TABLE S2. Cytogenetic aberrations observed as a single anomaly (n=68).

NUMERICAL	NUMBER OF CASES
+3/+i(3)(q10)	4
+4	2
+12	1
+18/+i(18)(q10)	2
+X	1
-X	1
-Y	2
+mar	3
STRUCTURAL	NUMBER OF CASES
Reciprocal translocation	
t(1;19;8)(p32;q13.3;p12)	1
t(2;7)(p11;q21.2-q22)	2
t(3;11)(q21;p13)	1
t(6;14)(p21;q32)	2
t(8;22)(q24;q11)	1
t(12;15)(p13;q23)	1
t(4;11)(p15;p15)	1
t(5;7)(p15;p11)	1
Non-reciprocal translocation	
der(6)t(3;6)(q12;p25)	1
der(7)t(3;7)(?;q32)	1
der(7)t(3;7)(q13?;p22)	1
der(9)t(9;12)(q34;q13)	1
der(12)t(12;12)(p13;q13)	1
der(20)t(12;20)(q13;p13)	1
Deletions	
del(1)(q32)	1
del(3)(p13)	1
del(6)(q21q24)	2
del(7)(q21q36)*	22
del(10)(q24.1q26.1)	1
del(17)(p13)	1
del(14)(q22)	1
Others	
dic(2;12)	1
add(6)(q?26)	1
ins(12;2)(p11;p13p21)	1
add(17)(p11)	1
dup(X)(q22q26)	1
add(X)(p22)	1
i(17)(q10)	1

*Deletion breakpoints at 7q are heterogeneous being q21 the most proximal and q36 the most terminal breakpoints.

TABLE S3. Translocations affecting 14q32 region detected in a series of 330 patients with SMZL.

TRANSLOCATION	NUMBER OF ALTERATIONS
t(1;14)(q21;q32)	2
t(1;14)(p34;q32)	1
t(1;14)(p22;q32)	1
t(6;14)(p21;q32)	3
t(9;14)(p13;q32)	3
t(9;14)(p11.3;q32)	1
t(11;14)(q21;q32)	1
t(12;14)(q23;q32)	1
t(14;19)(q32;q13)	4*
add(14)(q32)	14
dup(14)(q32.1q32.3)	1
TOTAL	32

(29 cases)

*Three of these cases showed other 14q32 alterations in the same karyotype: add(14)(q32); t(11;14)(q21;q32) and t(9;14)(p13;q32).

TABLE S4. Comparison of cytogenetic and FISH results.

ANOMALY	CONVENTIONAL CYTOGENETICS (% abnormal karyotype)	FISH RESULTS (n/cases studied by FISH) (%)
Trisomy 3/3q	58 (24.2%)	35/129 (27.1%)*
Trisomy 12	18 (8%)	3/36 (8.3%)
Deletion 7q	91 (38%)	2/5 (40%)
Deletion 11q	13 (5.4%)	0/16 (0%)
Deletion 13q14	9 (4%)	4/10 (40%)
t(14q32) (<i>IGH</i>)	26 (11%)	5/61 (8.2%)
del(17)(p13) (<i>TP53</i>)	21 (8.7%)	28/155 (18%)

*FISH results using *CEP3* and *BCL6* (3q) probes.

TABLE S5. Comparison of clinical and cytogenetic data in cases utilizing the *IGHV1-2* vs. other *IGHV* genes. Statistically significant ($P<0.05$) differences are highlighted in bold.

<i>Characteristics</i>	<i>IGHV1-2 group N (median or %)</i>	<i>Other IGHV group N (median or %)</i>	<i>P- value</i>
Age (years), ≥ 65 years	(62)	(69)	0.140
Sex (M/F)	0.6	1	0.242
Hemoglobin, g/dL, ≤ 12 g/dL	20/26 (76.9%)	25/54 (46.3%)	0.010
B ₂ -microglobulin, >3 mg/L	7/8 (87.5%)	8/14 (57.1%)	0.193
LDH, >450 mg/L	3/11 (27.3%)	2/20 (10%)	0.317
WBC, $\times 10^9/L$, $\geq 10 \times 10^9/L$	9/26 (34.6%)	29/51 (56.9%)	0.065
Lymphocytes, $\times 10^9/L$, $\geq 5 \times 10^9/L$	7/26 (26.9%)	28/52 (53.8%)	0.024
Villous lymphocytes	2/3 (66.7%)	8/16 (50%)	1.000
<i>IGHV</i> mutated	14/32 (43.7%)	45/68 (73.6%)	0.033
CD5 PB expression	4/17 (23.5%)	9/43 (20.9%)	1.000
Median survival time (years)	18.9	10.6	0.387
<i>Cytogenetic Findings</i>			
+3/+3q [^]	5/32 (15.6%)	22/68 (32.4%)	0.079
del(7q)	21/32 (65.6%)	22/68 (32.4%)	0.002
+12	2/32 (6.3%)	5/68 (7.4%)	1.000
14q altered	7/32 (21.9%)	3/68 (4.4%)	0.011
del <i>TP53</i>	3/19 (15.8%)	9/48 (18.8%)	1.000
+18 [^]	2/32 (6.3%)	10/68 (14.7)	0.328
6q [^]	6/32 (18.8%)	10/68 (14.7%)	0.607
Abnormal karyotype	30/32 (93.8%)	52/68 (76.5%)	0.036
Single anomaly	7/30 (23.3%)	17/52 (32.7%)	0.370
≥ 3 alterations	13/30 (43.3%)	28/52 (53.8%)	0.359

* Karyotype and FISH information was used for the statistical analysis of +3/+3q.

[^] Never as a single aberration.

Abbreviations: M: male; F: female; LDH: lactate dehydrogenase; WBC: white blood cell; PB: peripheral blood.

TABLE S6. Previous cytogenetic findings in SMZL.

SERIES	n	% abn	Cytogenetic abnormalities
• Oscier et al., 1993 ⁶	31	87	t(11;14)(q13;q32), 7q-, i(17q), t(2p11)
• Dierlamm et al., 1996 ⁷	10	70	+3
• Troussard et al., 1998 ⁹	44	43	14q abnormalities, t(11;14)(q13;q32), +3, +12 and abnormalities of 17p
• Gruzka-Westwood et al., 2001 ¹³	59	17	TP53 deletion (FISH)
• Solé et al., 2000 ¹⁰	47	70	7q-, +3/+3q, involvement of chromosomes 1 and 8
• Callet-Bauchu et al., 2005 ¹²	103	100*	+3/+3q, 7q-, +18/18q, 6q-, +12/+12q, 8p-
• Present series, 2009	330	67	7q-, +3/3q-, t(1q), t(8q), 6q-, +12/+12q, t(14q) abnormalities, Involvement of chromosomes 17 and 18

Abbreviations: abn: abnormal karyotype

*: selection criteria consisted in identification of abnormal metaphases

TABLE S7. Parameters with prognostic impact in SMZL. Review of the literature

Series	n	Parameters with prognostic impact
Gruzka-Westwoood et al. 2001 ¹³	59	TP53 deletion (FISH)
Algara et al., 2002 ¹⁵	35	Unmutated IGVH, deletion 7q (LOH)
Ruiz Ballesteros et al., 2005 ¹⁴	44	CD38 expression, unmutated IGVH, and the expression of a set of NFkB pathway genes, including TRAF5, REL, and PKCA.
Arcaini et al. 2006 ¹⁸	309	Hb level <12 g/dL, high LDH level and albumin level <35 g/L.
Present series	173/330	Hb level <12 g/dL, age >65 years-old, β_2 -microglobulin level >3mg/l >2 cytogenetic aberrations, TP53 deletion (FISH), 14q aberrations and 14q deletions

Figure S1. Over-all survival curves of our series of SMZL

Figure S2. Kaplan-Meier survival curves of the clinical parameters with prognostic impact

(A) Age >65 years-old; (B) Hb <12g/L; (C) β 2-microglobulin > 3mg/L; (D) Lymphocyte count < 4x10⁹/L .

Figure S1

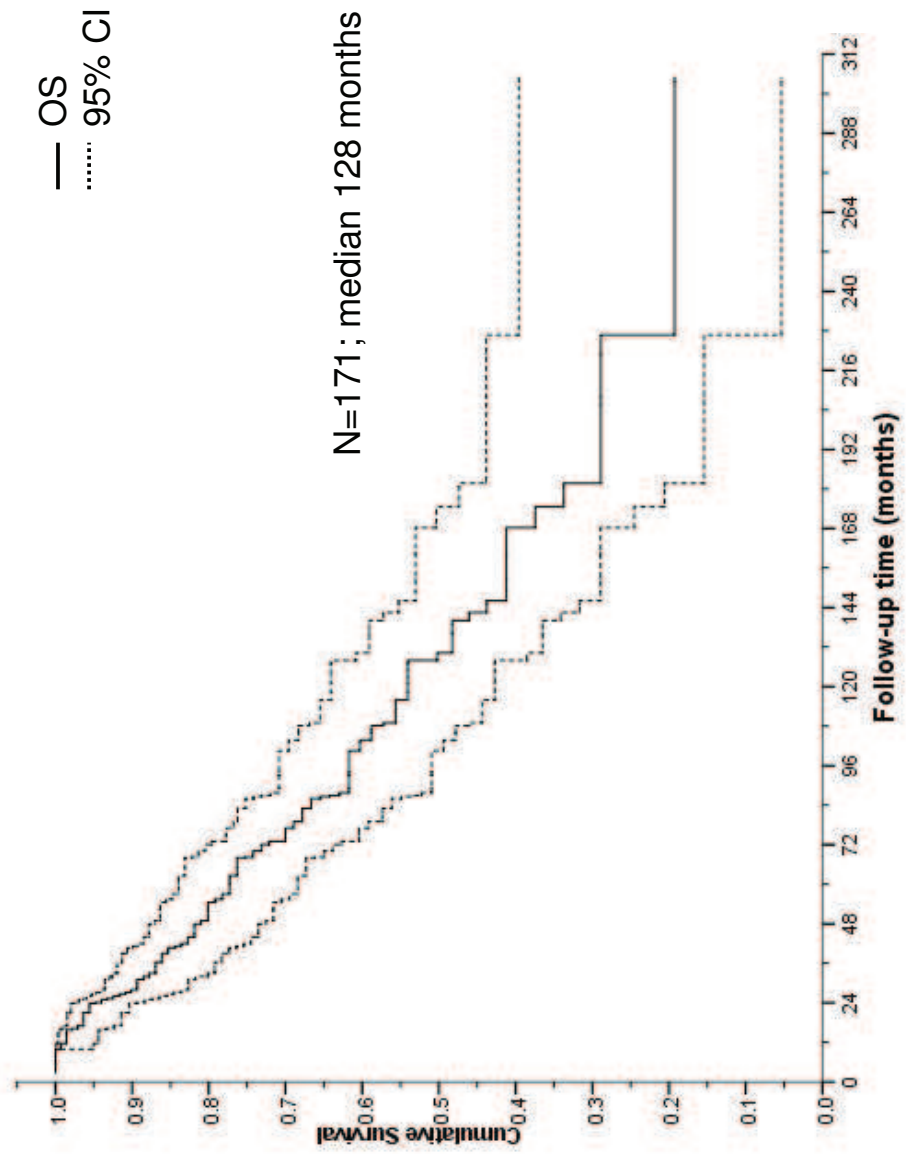


Figure S2

