

Tesis doctoral

Alteraciones del gen *MYC* en linfomas agresivos de células B: evaluación mediante FISH, relación con la expresión proteica y valor pronóstico.

Autor
Gustavo Tapia Meledo

Realizada bajo la dirección de:
José Luis Mate Sanz



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

Departamento de Ciencias Morfológicas y Cirugía
Programa de doctorado en Morfología y Patología estructural y molecular

Doctorado en Medicina

Universitat Autònoma de Barcelona

Barcelona, 2015

A mi família

A Susana

Agradecimientos

Durante estos años, son muchas las personas que han contribuido a que este proyecto saliera adelante. A todas ellas, me gustaría agradecerles su esfuerzo y dedicarles el resultado: este trabajo de tesis.

En primer lugar, este proyecto no habría sido posible sin la ayuda del Dr. José Luis Mate, mi director de tesis. Desde que empecé la residencia en el Hospital Germans Trias, el mundo de los linfocitos me pareció fascinante, y con el Dr. Mate aprendí a diagnosticar los procesos linfoproliferativos integrando sus características clínicas, morfológicas, fenotípicas, y moleculares. Son muchos los momentos compartidos a los mandos del microscopio discutiendo sobre esta afición que tenemos en común.

Al Dr. Aurelio Ariza, por su esfuerzo en crear un clima propicio en el que hubiera no sólo la infraestructura necesaria, sino también un ambiente científico de discusión para poder desarrollar esta tesis, así como por su amplia visión de la anatomía patológica como un punto de encuentro e integración entre las ciencias básicas y la medicina aplicada.

A todos los compañeros que han participado en los diferentes trabajos de esta tesis. En primer lugar a la Dra. Raquel López, con quien empezó este viaje, por su confianza y su apoyo incondicional, tanto a nivel profesional como personal. A las Dras. Ana Muñoz y Carolina Sanz, con quienes he podido compartir inquietudes e ideas, por su paciencia y su minuciosidad. A Ruth Marginet, por todas las horas invertidas y por su optimismo. Al Dr. Ayman Gaafar, por su amistad y su apoyo desinteresado. A los compañeros del departamento de hematología: a la Dra. Joao Baptista, por todos los ratos compartidos, el Dr. Tomas Navarro por sus consejos y su dedicación, y el Dr. Juan Manuel Sancho, por contribuir con sus conocimientos clínicos. A la Dra. Olga García, por su ayuda con el análisis estadísticos. Al Dr. Josep Maria Ribera, por sus valiosos comentarios.

A todo el personal del departamento de Anatomía Patológica, en especial a Geli y Montse, por su paciencia conmigo. A mis compañeras de despacho, Maika Gómez y Ariadna Quer, por todas las molestias ocasionadas. A Eva Castellà, por sus consejos.

A Isabel Ojanguren, por todos los momentos con microscopio o con comida de por medio. Al Dr. Picatoste, que desde el principio supo que este momento llegaría.

Y a Susana Sabaté, por su confianza y apoyo incondicional. Por todas las horas dedicadas a dar forma a este trabajo. Por escucharme. ¡Y por aguantarme!

Esta tesis ha generado las siguientes publicaciones:

I. Tapia G, López R, Muñoz-Mármol AM, Mate JL, Sanz C, Marginet R, Navarro JT, Ribera JM, Ariza A. Immunohistochemical detection of MYC protein correlates with *MYC* gene *status* in aggressive B-cell lymphomas. *Histopathology* 2011;59:672-678.

II. Muñoz-Mármol AM, Sanz C, Tapia G, Marginet R, Ariza A, Mate JL. *MYC* determination in aggressive B-cell lymphoma: the impact of FISH probe selection. *Histopathology* 2013;63(3):418-24.

III. Tapia G, Baptista MJ, Muñoz-Marmol AM, Gaafar A, Puente-Pomposo M, García O, Marginet-Flinch R, Sanz C, Navarro JT, Sancho JM, Ribera JM, Ariza A, Mate JL. MYC protein expression is associated with poor prognosis in primary diffuse large B-cell lymphoma of the central nervous system. *APMIS* 2015;123(7):596-603.

Índice

ACRÓNIMOS	13
1. INTRODUCCIÓN	19
1.1. Tejidos linfoides: estructura y función	21
1.2. Clasificación de los linfomas	24
1.2.1. Linfoma difuso de células grandes B (DLBCL)	25
1.2.2. Linfoma de Burkitt (BL)	29
1.2.3. Linfoma de células B, inclasificable, de características intermedias entre DLBCL y BL (BCLU)	32
1.2.4. DLBCL primario del sistema nervioso central (CNS-DLBCL)	35
1.3. MYC: gen y proteína	37
1.3.1. Estructura del gen <i>MYC</i>	37
1.3.2. La proteína MYC	38
1.3.3. Regulación del gen <i>MYC</i>	39
1.3.4. Función del gen <i>MYC</i>	39
1.4. Desregulación del gen <i>MYC</i> en linfomas B agresivos	40
1.4.1. <i>MYC</i> en el linfoma de Burkitt (BL)	41
1.4.2. <i>MYC</i> en el linfoma difuso de células grandes B (DLBCL)	44
1.4.3. <i>MYC</i> en el linfoma de células B, inclasificable, de características intermedias entre DLBCL y BL (BCLU)	45
1.4.4. <i>MYC</i> en el DLBCL primario del sistema nervioso central (CNS-DLBCL)	46
1.5. Métodos de estudio de las traslocaciones del gen <i>MYC</i>	46
1.5.1 FISH con sondas de fusión o de colocalización	47
1.5.2 FISH con sondas de separación	47
2. HIPÓTESIS	51
3. OBJETIVOS	55
4. RESULTADOS	59
4.1. Trabajo 1: La detección inmunohistoquímica de la proteína MYC se correlaciona con el estado del gen <i>MYC</i> en los linfomas agresivos de células B.	61

4.2. Trabajo 2: Determinación del estado del gen <i>MYC</i> en linfomas agresivos de células B: impacto de la selección de la sonda FISH.	71
4.3. Trabajo 3: La expresión de la proteína <i>MYC</i> se asocia a un peor pronóstico en el linfoma difuso de células grandes B primario del sistema nervioso central.	81
5. DISCUSIÓN	91
6. CONCLUSIONES	101
7. REFERENCIAS	105

Acrónimos

BCL2

Gen de la célula B de la Leucemia / Linfoma linfocítica crónica 2 (del inglés, *B-Cell CLL / Lymphoma 2*).

BCL6

Gen de la célula B de la Leucemia / Linfoma linfocítica crónica 6 (del inglés, *B-Cell CLL / Lymphoma 6*).

BCLU

Linfoma de células B, inclasificable, de características intermedias entre BL y DLBCL (del inglés, *B-Cell Lymphoma, Unclassifiable, with features intermediate between diffuse large B-cell lymphoma and Burkitt lymphoma*).

BCR

Receptor de la célula B (del inglés, *B-Cell Receptor*).

bHLH-LZ

Proteína básica con motivos hélice-bucle-hélice con cremalleras de leucina (del inglés, *Basic Hélix-Loop-Helix Leucine Zipper*).

BL

Linfoma de Burkitt (del inglés, *Burkitt's Lymphoma*).

BLIMP1

Proteína 1 de maduración inducida por linfocitos B (del inglés, *B-Lymphocyte-Induced Maturation Protein 1*).

BR

Región básica (del inglés, *Basic Region*).

BVR1:

Región variante de Burkitt 1 (del inglés, *Burkitt Variant Region 1*).

BVR2:

Región variante de Burkitt 2 (del inglés, *Burkitt Variant Region 2*).

CD

Grupo de diferenciación (del inglés, *Cluster of Differentiation*).

CHOP

Ciclofosfamida, Doxorubicina, Vincristina y Prednisona.

CLL

Leucemia linfática crónica (del inglés, *Chronic Lymphocytic Leukemia*).

CNS

Sistema nervioso central (del inglés, *Central Nervous System*).

CNS-DLBCL

Linfoma difuso de células grandes B, primario del sistema nervioso central (del inglés, *Primary Diffuse Large B-Cell lymphoma of the Central Nervous System*).

DLBCL

Linfoma difuso de células grandes B (del inglés, *Diffuse Large B-Cell Lymphoma*).

DNA

Ácido desoxiribunocléico (del inglés, *Desoxyribunocleic Acid*).

ECOG

Grupo oncológico cooperativo del este (del inglés, *Eastern Cooperative Oncology Group*).

FDC

Célula folicular dendrítica (del inglés, *Follicular Dendritic Cell*).

FISH

Hibridación in situ fluorescente (del inglés, *Fluorescent In Situ Hybridization*).

FL

Linfoma folicular (del inglés, *Follicular lymphoma*).

IG

Inmunoglobulina.

IGH

Cadena pesada de las inmunoglobulinas (del inglés, *Immunoglobulin Heavy chain*).

IGK

Cadena ligera kappa de las inmunoglobulinas (del inglés *Immunoglobulin Kappa chain*).

IGL

Cadena ligera lambda de las inmunoglobulinas (del inglés, *Immunoglobulin Lambda chain*).

IRF4

Factor regulador del interferon 4 (del inglés, *Interferon Regulatory Factor 4*).

IPI

Índice Pronóstico Internacional.

MALT

Tejido linfoide asociado a mucosas (del inglés, *Mucosa-Associated Lymphoid Tissue*).

MB

Cajas MYC (del inglés, *MYC Boxes*).

MCL

Linfoma de células del manto (del inglés, *Mantle Cell lymphoma*).

mRNA

Ácido ribonucleico mensajero (del inglés, *Messenger Ribonucleic Acid*).

miRNA

micro-RNA.

MUM1

Oncogen del mieloma múltiple 1 (del inglés, *Multiple Myeloma oncogene 1*).

MYC

Oncogen viral homólogo de la mielocitomatosis aviar V-*myc*.

MYC+

Linfoma con traslocación del gen *MYC*.

MYC-

Linfoma sin traslocación del gen *MYC*.

MZL

Linfoma de la zona marginal (del inglés, *Marginal Zone Lymphoma*).

NF-κB

Factor nuclear kappa B (del inglés, *Nuclear Factor Kappa B*).

NLPHL

Linfoma de Hodgkin nodular de predominio linfocítico (del inglés, *Nodular Lymphocytic Predominant Hodgkin Lymphoma*).

NLS

Señal de localización nuclear (del inglés, *Nuclear Localization Signal*).

OS

Supervivencia global (del inglés, *Overall Survival*).

R-CHOP

Rituximab y CHOP.

SLL

Linfoma linfocítico (del inglés, *Small Lymphocytic Lymphoma*).

TCR

Receptor de la célula T (del inglés, *T-Cell Receptor*).

VEB

Virus de Epstein-Barr.

VIH

Virus de la Inmunodeficiencia Humana.

WHO

Organización mundial de la salud (del inglés, *World Health Organization*).

1. Introducción



2. Hipótesis



3. Objetivos



4. Resultados



5. Discusión



6. Conclusiones



7. Referencias



1. Introducción



1. Introducción

1.1. Tejidos linfoides: estructura y función

Los tejidos linfoides son el lugar donde las células inmunes residen, proliferan y se diferencian hacia células inmunocompetentes. En base a su función y al estado de maduración de las células linfoides que lo constituyen, los tejidos linfoides se dividen en dos grupos principales: los tejidos linfoides centrales o primarios y los tejidos linfoides periféricos o secundarios.

Los tejidos linfoides centrales o primarios son la médula ósea y el timo. En ellos se encuentran las células linfoides precursoras y tiene lugar el proceso de diferenciación independiente de antígeno. En la médula ósea se generan los linfocitos inmaduros B y T, y se produce el primer proceso de diferenciación de las células B: el reordenamiento de los segmentos V (variable), D (*diversity*) y J (*joining*) de los genes de las inmunoglobulinas (IG). Los linfocitos inmaduros T generados en la médula ósea viajan al timo, el órgano linfoide primario en el que estos linfocitos sufren los primeros procesos de diferenciación con el reordenamiento del gen del receptor de la célula T (TCR).

Los tejidos periféricos o secundarios son los ganglios linfáticos, el bazo, y el tejido linfoide asociado a mucosas (MALT). En ellos, las células linfoides B y T se enfrentarán a los antígenos y tendrá lugar la diferenciación dependiente de antígeno. El ganglio linfático, así como el resto de órganos lin-

foides secundarios, se organizan alrededor de una estructura princeps que es el folículo linfoide. Las células linfoides B *naive*, procedentes de la médula ósea, junto con células presentadoras de antígenos (las células foliculares dendríticas o FDC) forman los folículos linfoides primarios, que carecen de centro germinal. Cuando estas células linfoides reconocen un antígeno y son estimuladas por éste, se produce su expansión dando lugar a los folículos linfoides secundarios, que se componen de dentro a fuera por el centro germinal, el manto y la zona marginal.

En el centro germinal se pueden identificar dos áreas bien diferenciadas desde el punto de vista morfológico y funcional: la zona clara y la zona oscura. En la zona oscura las células predominantes son los centroblastos, unos linfocitos B de tamaño intermedio grande, con uno o varios nucléolos cercanos a la membrana nuclear. Los centroblastos proliferan con gran rapidez en la zona oscura del folículo linfoide, y durante este proceso de proliferación sufren un gran número de mutaciones en la región V del gen de las IGs, lo que se conoce como “hipermutación somática”. Mediante este proceso de hipermutación, las células linfoides consiguen aumentar la variabilidad de las IGs producidas, de forma que algunas tendrán mayor afinidad por el antígeno, mientras que otras tendrán menor afinidad.

Los centroblastos maduran a centrocitos, unos linfocitos de pequeño tamaño y núcleo irregular, los cuales se sitúan en la

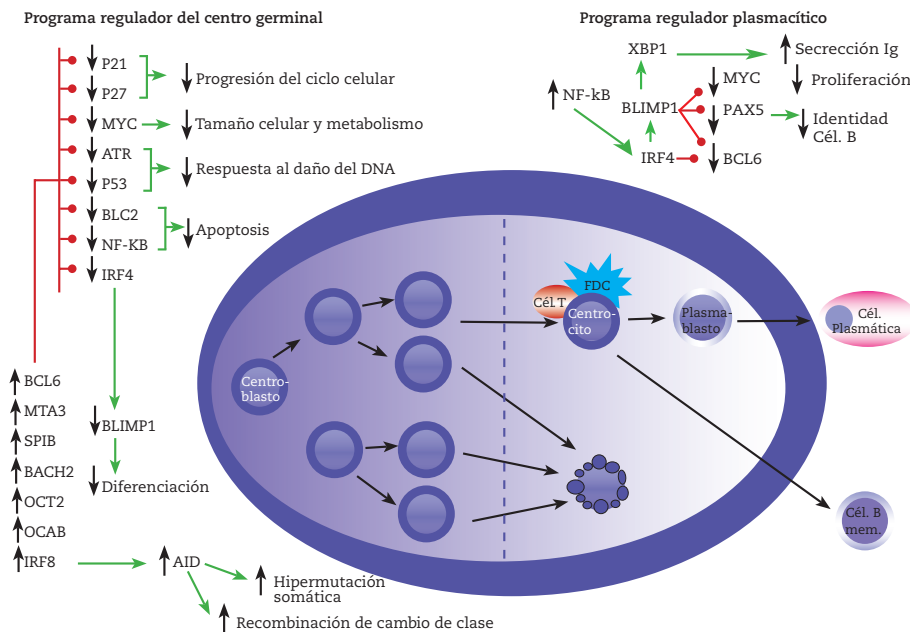
zona clara del centro germinal. Los centrocitos experimentan un cambio de isotipo de inmunoglobulina (de la expresión de la región constante de la cadena pesada de las inmunoglobulinas), de forma que pasarán de ser IGM a IGG, IGA o, con menor frecuencia, IGE. Aquellos centrocitos que hayan sufrido una pérdida de afinidad por el antígeno debido a la hipermutación somática, morirán mediante apoptosis, mientras que aquellos que hayan mejorado su afinidad por el antígeno serán capaces de sobrevivir gracias a la interacción con las FDC y las células T helper específicas de antígeno del centro germinal.

Por fuera del centro germinal se encuentra la zona del manto, formada básicamente por linfocitos *naïve* que entrarán en el centro germinal al reconocer y ser estimulados

por un antígeno. Por último, en el bazo, en el tejido linfoide asociado a mucosas y en algunos ganglios linfáticos (especialmente los ganglios mesentéricos), por fuera del manto se puede observar la zona marginal. La zona marginal está formada por una mezcla de linfocitos *naïve* y linfocitos B de memoria, procedentes de la maduración de los centrocitos.

La maduración y diferenciación de los linfocitos B se ve reflejada en el perfil de expresión inmunofenotípico de los mismos. Así, los linfocitos *naïve* del manto expresan, además de los marcadores B habituales (CD19, CD20, PAX5, etc.) los antígenos CD23 y CD21, y ocasionalmente también coexpresan CD5. Los centroblastos y centrocitos del centro germinal, expresan dos marcadores de centro germinal: CD10 y BCL6. CD10 tie-

Figura 1. Diferenciación celular en el centro germinal. Adaptación de Lenz G *et al*, 2010. Las líneas rojas indican que un factor regulador inhibe un gen o una función determinada, y las líneas verdes indican una regulación positiva o activación.

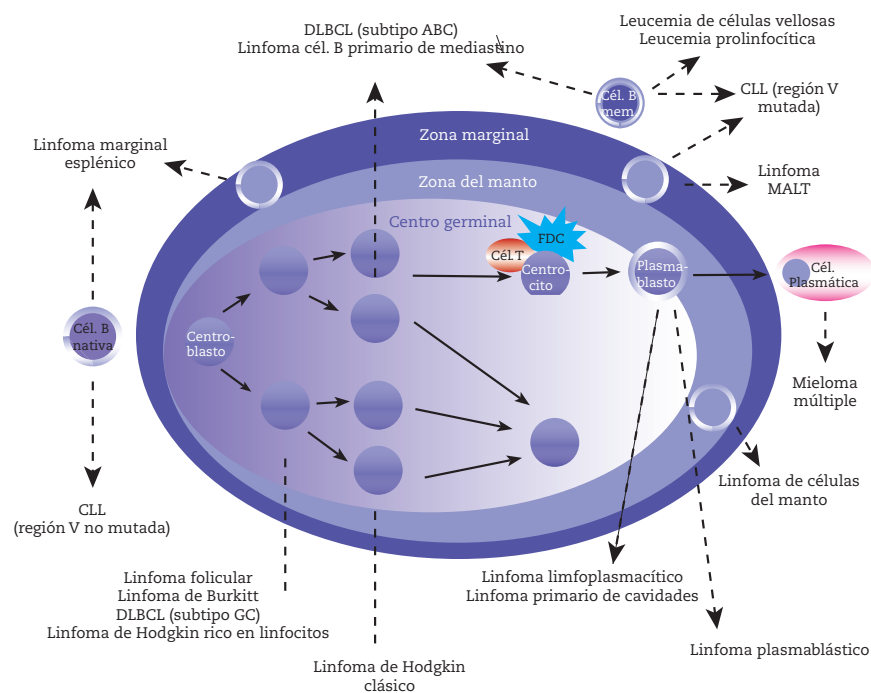


ne una función no bien conocida, pero se cree que su expresión es fundamental en la formación del centro germinal. El factor de transcripción BCL6 regula un gran número de genes, y actúa sobre los mecanismos de regulación de la proliferación, la diferenciación celular y la respuesta al daño en el ácido desoxiribunocléico (DNA). La proteína p53 es su principal diana. A través de p53, por un lado inhibe a p21, de forma que facilita la proliferación celular, y por otro lado, inhibe a ATM y ATR, lo cual permite una mayor tolerancia a los cambios en el DNA, indispensable para los mecanismos de hipermutación somática y cambio de isotipo de IGs. BCL6 también regula la diferenciación celular, inhibiendo la maduración de los centrocitos hacia células plasmáticas y células B de memoria, a través de la inhibición de BLIMP1. De forma característica, los

centroblastos y centrocitos del centro germinal tienen inhibida la expresión de moléculas antiapoptóticas como BCL2, lo que les hace susceptibles a la muerte celular por apoptosis, por lo que su supervivencia dependerá de la capacidad de unirse con mayor afinidad al determinante antigénico presente en el centro germinal (Lenz e Staudt, 2010). Finalmente, la salida del centro germinal de los centrocitos, y su diferenciación post-centro germinal a célula plasmática o célula B de memoria, requiere la expresión de los factores IRF4 y BLIMP1, a la vez que la inhibición de BCL6 (figura 1).

Las neoplasias de células linfoides reflejan en buena medida los diferentes estadios de maduración de las células linfoides B normales, tanto desde el punto de vista morfológico como inmunofenotípico. Esta

Figura 2. Origen celular de los linfomas de células B. Adaptado de Valera 2013 (Valera, 2013).



semejanza es utilizada a la hora de clasificar y denominar las neoplasias linfoides. Así, por ejemplo, la mayor parte de los linfomas de células del manto (MCL) y de las leucemias linfáticas crónicas (CLL) / linfomas linfocíticos (SLL) se creen originados de las células B *naïve* del manto folicular. Del centro germinal del folículo linfoide derivarían el linfoma folicular (FL), el linfoma de Burkitt (BL) y algunos tipos de linfoma difuso de células grandes B (DLBCL), y todos ellos se caracterizan por la expresión de marcadores de centro germinal como CD10 y BCL6. El linfoma de Hodgkin, a su vez, derivaría del centro germinal y, al igual que los FL, BL y DLBCL, las células que lo forman tienen hipermutación somática de las IGs. Finalmente, tanto el linfoma de la zona marginal (MZL) como el linfoma del tejido linfoide asociado a mucosas (linfoma MALT), se originarían de células B de memoria de la zona marginal mientras que las neoplasias de células plasmáticas, como su nombre indica, tendrían su origen en las células plasmáticas (figura 2).

1.2. Clasificación de los linfomas

Las neoplasias de células linfoides se pueden presentar clínicamente en forma de leucemia (expresión en sangre periférica), de linfoma (en forma de masa tumoral, ganglionar o extraganglionar) o de ambos a la vez. La Organización Mundial de la Salud (WHO), en su clasificación más reciente de 2008, divide las neoplasias linfoides en neoplasias de células linfoides precursoras, de linfocitos maduros B, T o NK, linfoma de Hodgkin y enfermedades linfoproliferativas asociadas a inmunodeficiencia (Swerdlow, 2008). De entre los linfomas de linfocitos maduros B, se reconocen varias entidades

Tabla 1. Linfomas B agresivos (WHO 2008)

<p>Linfoma de Burkitt (BL) Linfoma difuso de células grandes B (DLBCL) DLBCL, sin otras especificaciones (NOS) Variantes morfológicas comunes Centroblástica Inmunoblástica Anaplásica Variantes morfológicas infrecuentes Subgrupos moleculares Tipo centro germinal (GC) Tipo célula B activada (ABC) Subgrupos inmunohistoquímicos DLBCL CD5 positivo Tipo centro germinal (GC) Tipo no-centro germinal (no-GC) Subtipos de DLBCL Linfoma B de células grandes, rico en células T/histiocitos PDLBCL, primario del sistema nervioso central (CNS-DLBCL) DLBCL primario cutáneo, tipo piernas DLBCL EBV positivo asociado a la edad Otros linfomas de células B grandes Linfoma de células B grandes, primario mediastínico (tímico) Linfoma de células B grandes intravascular DLBCL asociado a inflamación crónica Granulomatosis linfomatoide DLBCL, ALK positivo Linfoma plasmablástico Linfoma de células B grandes asociado a la enfermedad de Castleman multicéntrica HHV8 positiva Linfoma de cavidades Casos intermedios Linfoma de células B, inclasificable, de características intermedias entre DLBCL y BL (BCLU) Linfoma de células B, inclasificable, de características intermedias entre DLBCL y linfoma de Hodgkin clásico</p>
--

especialmente agresivas, con sus variantes y subtipos correspondientes (tabla 1. Adaptación de Swerdlow 2008).

La presente tesis se centra, en sus dos primeros trabajos, en DLBCL, BL y BCLU, mientras que el último trabajo explora las características de un subtipo concreto de DLBCL: el linfoma difuso de células grandes B primario del sistema nervioso central (CNS-DLBCL).

1.2.1. Linfoma difuso de células grandes B (DLBCL)

El DLBCL es una neoplasia constituida por linfocitos B de tamaño intermedio o grande, que proliferan de forma difusa destruyendo la arquitectura del ganglio linfático o el órgano en el que asienta. El tamaño grande de las células neoplásicas se define como un tamaño nuclear igual al de un macrófago o más del doble de un linfocito normal. Existen diferentes subtipos de DLBCL con características clínico-patológicas y biológicas específicas, como los linfomas primarios del sistema nervioso central o los primarios cutáneos, mientras que el resto de casos constituyen un grupo heterogéneo de neoplasias que se engloban en el grupo de DLBCL sin otras especificaciones (NOS).

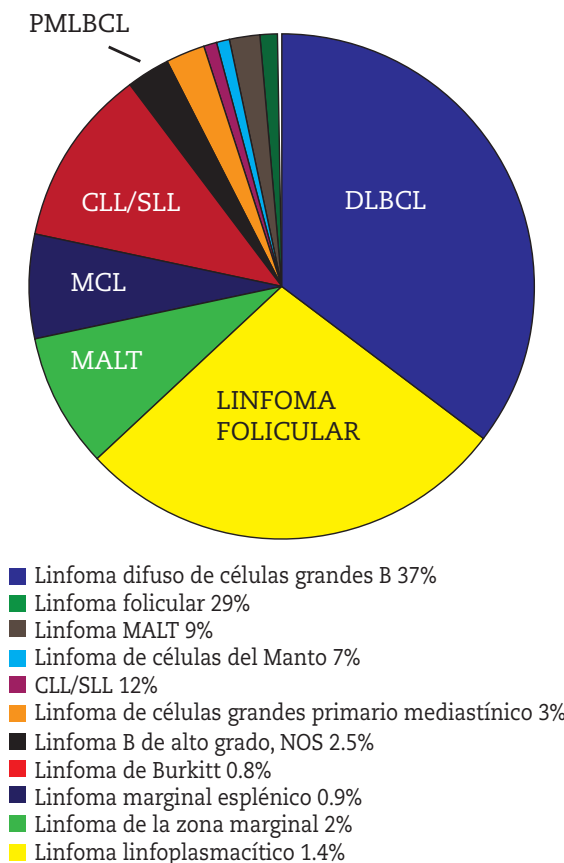
EPIDEMIOLOGÍA

El LDCGB NOS es el linfoma más frecuente, y representa alrededor del 37% de los linfomas no-Hodgkin de células B (figura 3. Adaptación de Swerdlow, 2008). La edad media de presentación es la séptima década, si bien puede afectar a pacientes de cualquier edad. En cuanto a la distribución por sexos, existe un ligero predominio en el sexo masculino, siendo la ratio hombres: mujeres de 1.2:1 (Jaffe, 2011).

ETIOLOGÍA

La mayoría de los DLBCL se producen de novo (DLBCL primarios), pero en ocasiones son consecuencia de la transformación o la progresión de un linfoma B de bajo grado (DLBCL secundarios), como un FL, CLL-SLL, MZL o linfoma de Hodgkin. La etiología es desconocida en la mayor parte de los casos, y habitualmente, los pacientes no tienen factores de riesgo conocidos. Sin embargo, en algunos casos existe una in-

Figura 3. Frecuencia relativa de los subtipos de linfomas B en adultos.



munodeficiencia subyacente, congénita (inmunodeficiencia común variable, inmunodeficiencia severa combinada, ataxia-telangiectasia, etc) o adquirida (infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), trasplante de órganos sólidos o de médula ósea, tratamiento inmunosupresor). Los casos producidos en el contexto de una inmunodeficiencia subyacente están asociados al virus de Epstein-Barr (VEB) con mayor frecuencia que los DLBCL esporádicos. Por último, existen casos de DLBCL asociados al VEB en el contexto de pacientes de edad avanzada (mayor a 50 años) en los que no existe una inmunodeficiencia manifiesta.

ta. En estos casos, se cree que los pacientes tendrían cierta inmunodeficiencia provocada por un deterioro del sistema inmunológico asociado a la edad.

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

Los pacientes con DLBCL se presentan habitualmente con adenopatías y/o masas tumorales extranodales de crecimiento rápido, con o sin síntomas B (fiebre, sudoración nocturna y pérdida de peso). Se pueden producir otros síntomas variables, en función de la localización de las masas tumorales. Aproximadamente el 40% de los casos debutan en localización extranodal, y hasta un 71% tienen afectación extranodal a lo largo de la evolución de la enfermedad. Prácticamente cualquier órgano puede ser afectado por el DLBCL, siendo las localizaciones extraganglionares más frecuentes el tracto gastrointestinal (especialmente estómago y región íleo-cecal), el anillo de Waldeyer, bazo, hígado, hueso, testículo, glándulas salivares, riñones y partes blandas. Como se ha mencionado con anterioridad, determinadas localizaciones primarias como la piel o el sistema nervioso central, tienen especial relevancia desde el punto de vista biológico y clínico-patológico.

Aproximadamente la mitad de los DLBCL son diagnosticados en fases iniciales (estadios I y II), y la infiltración de la médula ósea se produce en el 11-27% de los pacientes.

MORFOLOGÍA

Los órganos afectados por el DLBCL habitualmente presentan una morfología totalmente borrada por un infiltrado difuso de células linfoides grandes, en ocasiones con necrosis e infiltración de tejidos adyacentes. Con menor frecuencia, la arquitectura se encuentra alterada únicamente de forma parcial, con una infiltración neoplásica en-

tre folículos linfoides preservados (patrón interfolicular) o con disposición sinusoidal, imitando a las metástasis de neoplasias epiteliales. En ocasiones, se observan abundantes macrófagos fagocitando detritus celulares intercalados entre las células neoplásicas, dando un aspecto en “cielo estrellado”, lo que plantea el diagnóstico diferencial con el linfoma de Burkitt.

Desde el punto de vista citológico, se describen tres variantes comunes y otras poco frecuentes. Las variantes comunes son la centroblástica, la inmunoblástica y la anaplásica. En la variante centroblástica, que es la más frecuente, las células neoplásicas (centroblastos) son de tamaño intermedio-grande, con una cromatina vesicular y dos o tres nucléolos adyacentes a la membrana nuclear. Habitualmente, los centroblastos se encuentran entremezclados con otras células neoplásicas de núcleo redondo u ovalado, con un nucléolo central prominente (inmunoblastos) en proporción variable, mientras que en ocasiones los centroblastos constituyen más del 90% de las células neoplásicas. En la variante inmunoblástica, más del 90% de las células neoplásicas son inmunoblastos. La distinción entre estas dos variantes morfológicas es poco reproducible, ya que se observa gran variabilidad intra-observador e inter-observador. La variante anaplásica está constituida por células linfoides grandes con núcleos bizarros, pleomórficos, en ocasiones multinucleados, y citoplasma amplio. Entre las variantes poco frecuentes podemos encontrar células en anillo de sello, células con abundantes microvilli, células fusiformes, o la presencia de un estroma mixoide o fibrilar.

IMMUNOFENOTIPO

El inmunofenotipo de los DLBCL es muy variable, de manera que lo característico es que no existe un inmunofenotipo característico. Los marcadores de diferenciación de línea B (PAX5, CD19, CD20, CD22, CD79a y CD79b, etc) son positivos en la mayoría de los casos, aunque en ocasiones se observa negatividad para uno o más de ellos. Los marcadores de diferenciación de línea T son negativos, excepto CD5, que es positivo en aproximadamente el 10% de los DLBCL. El porcentaje de casos que expresan CD10, BCL6, BCL2 o MUM1 es muy variable en la literatura, en parte debido a la falta de homogeneidad en los criterios para clasificar un caso como positivo o negativo para cada uno de estos marcadores. Algunos DLBCL expresan CD30, y otros expresan marcadores asociados con diferenciación plasmocelular como CD38, CD138 o VS38c. El porcentaje de células en proliferación (Ki67) suele estar comprendido entre el 40% y el 90%.

SUBGRUPOS MOLECULARES Y SUBGRUPOS INMUNOHISTOQUÍMICOS

Mediante estudios de expresión génica se han identificado dos subgrupos moleculares de DLBCL. El primer subgrupo lo forman linfomas con un patrón de expresión génica similar al de las células B del centro germinal (GCB-like DLBCL), mientras que el segundo está compuesto por linfomas con un patrón similar al de células B activadas de sangre periférica (ABC-like DLBCL) (Alizadeh *et al.*, 2000; Rosenwald *et al.*, 2002). Estos subgrupos moleculares delimitan dos grupos de pacientes con diferente pronóstico, tanto en la era pre-Rituximab como posteriormente a la inclusión de Rituximab en los regímenes de quimioterapia (Fu *et al.*, 2008). En la práctica diaria, resulta difícil utilizar arrays de expresión génica, por lo

que se ha intentado reproducir los subgrupos moleculares mediante marcadores inmunohistoquímicos. En este sentido, se han propuesto varios algoritmos inmunohistoquímicos, entre los que se encuentran los de Hans, Muris, Choi, Nyman, Visco-Young o Tally (Hans *et al.*, 2004; Muris *et al.*, 2006; Choi *et al.*, 2009; Nyman *et al.*, 2009; Meyer *et al.*, 2011; Visco *et al.*, 2012). En estos algoritmos, mediante unos pocos marcadores inmunohistoquímicos, los casos se dividen en GC-like y no-GC-like. Sin embargo, la concordancia entre los resultados obtenidos por arrays de expresión génica y los diferentes algoritmos diagnósticos es variable, y la capacidad de éstos para predecir el comportamiento de los DLBCL no está clara (Coutinho *et al.*, 2013; Culpin *et al.*, 2013).

CARACTERÍSTICAS GENÉTICAS

Los DLBCL con frecuencia presentan mutaciones genéticas y traslocaciones. Respecto a las mutaciones, hasta el 50% de los casos presentan hipermutaciones somáticas en oncogenes como *PIM1*, *MYC*, *Rho/TTF* o *PAX5*, y se cree que éstas contribuyen de alguna forma a la oncogénesis de la neoplasia. Con frecuencia, existen también mutaciones en *BCL6*, *TP53*, *CARD11*, *CD79b* y *MYD88*, entre otros (Pasqualucci *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2013).

Respecto a las traslocaciones, las más significativas son las que afectan a los genes *BCL2*, *BCL6* y *MYC*. El gen *BCL2*, situado en la banda cromosómica 18q21.3, se encuentra traslocado en aproximadamente el 20% de los casos de DLBCL. La traslocación de *BCL2* tiene lugar con los genes de las IGS, habitualmente con la *IGH* [t(14;18)(q32;q21.3)] o con *IGK* o *IGL* [t(2;18)(p1;q21.3) o t(18;22)(q21.3;q11)] respectivamente. Algunos de estos casos corresponden a la transformación de un linfoma folicular preexistente,

pero otros son DLBCL de novo. La traslocación de *BCL2* se produce con mayor frecuencia en GCB-like DLBCLs y se asocia a una mayor expresión de la proteína BCL2 y a un comportamiento más agresivo (Visco *et al.*, 2013). El gen *BCL6*, situado en la banda cromosómica 3q27, se encuentra traslocado en aproximadamente el 30% de los DLBCL, constituyendo la alteración citogenética más frecuente. La traslocación de *BCL6* se puede producir con *IGH*, *IGK*, *IGL* o con un gran número de genes diferentes. Por otro lado, el gen *BCL6* presenta mutaciones en hasta el 70% de los casos, y éstas no se encuentran relacionadas con la existencia o no de traslocaciones. Las alteraciones moleculares de *BCL6* se dan con mayor frecuencia en los ABC-DLBCL (Iqbal *et al.*, 2007). El gen *MYC*, situado en la banda cromosómica 8q24, se encuentra traslocado en aproximadamente el 5-14 % de los casos. La traslocación de *MYC* puede producirse con el gen de la *IGH* [t(8;14)(q24;q32)], típica del linfoma de Burkitt, aunque en más del 50% de los casos afecta a *IGK*, *IGL* o a otros genes no-IG. A diferencia de lo que ocurre en el BL, el reordenamiento del gen *MYC* en los DLBCL con frecuencia se produce en el contexto de un cariotipo complejo, y puede asociarse a las traslocaciones de los genes *BCL2* y/o *BCL6* en lo que se conoce como linfomas “*doble-hit*” y “*triple-hit*”. Desde el punto de vista de los subgrupos moleculares, las alteraciones del gen *MYC* son más frecuentes en los GC-like DLBCL (Ott, Rosenwald e Campo, 2013; Aukema *et al.*, 2014).

PRONÓSTICO Y FACTORES PREDICTIVOS

El DLBCL es un linfoma agresivo con una alta mortalidad en pacientes no tratados. Sin embargo, con un tratamiento adecuado se consigue la curación en una elevada proporción de pacientes. El tratamiento habitual

consiste en la combinación de ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, prednisona (CHOP) junto con rituximab, un anticuerpo monoclonal quimérico que se une de forma específica a CD20 (R-CHOP) (Sehn *et al.*, 2005; Coiffier *et al.*, 2010).

Se han propuesto un gran número de factores pronósticos: clínicos, morfológicos, inmunohistoquímicos y moleculares, muchos de ellos con resultados variables en diferentes estudios, y con pacientes tratados con CHOP sin rituximab. (tabla 2. Adaptado de Jaffe, 2011).

El índice pronóstico internacional (IPI), el IPI ajustado a la edad (aa-IPI) y el IPI ajustado para pacientes tratados con R-CHOP son índices pronósticos que reúnen diferentes variables clínicas y han sido validados como modelos predictivos en múltiples estudios, tanto en pacientes tratados con CHOP como en los tratados con R-CHOP (A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project, 1993; Sehn *et al.*, 2007; Ziepert *et al.*, 2010). La infiltración de la médula ósea con una morfología concordante (de células grandes) con el linfoma primario se asocia a una peor supervivencia que la infiltración con una morfología discordante (de células pequeñas) (Campbell *et al.*, 2006). Como se ha mencionado con anterioridad, el subgrupo molecular ABC-like DLBCL tiene un comportamiento más agresivo que el GCB-like DLBCL, tanto en pacientes tratados con CHOP como en los tratados con R-CHOP (Fu *et al.*, 2008).

Desde el punto de vista de las alteraciones moleculares, la traslocación del gen *BCL2* ha sido relacionada con un peor pronóstico en el subgrupo de pacientes con GC-like DLB-

Tabla 2. Factores de mal pronóstico en DLBCLs

<p>Clínicos</p> <ul style="list-style-type: none"> • IPI elevado* <p>Morfológicos</p> <ul style="list-style-type: none"> • Morfología inmunoblástica o plasmablástica <p>Inmunohistoquímicos</p> <ul style="list-style-type: none"> • Expresión de BCL2* • Ausencia de fenotipo GC (CD10-.BCL6-, o al aplicar el algoritmo de Hans)* • Expresión de CD5 • Elevada proliferación (Ki-67) (controvertido) • Expresión de IRF4/MUM-1 • Inmunopositividad para p53 • Expresión de CD44s • Ausencia de expresión HLA-DR • Expresión nuclear de P14 (ARF) • Expresión de Ciclina D3 en $\geq 50\%$ de las células neoplásicas • Expresión de Ciclina D2 • Expresión de Proteína Quinasa C-β • Escasa respuesta de células T intratumoral • Número elevado de células T granzima B positivas intratumorales • Expresión citoplasmática de proteína ALK • Perfil de inhibición de Caspasa 9 <p>Molecular</p> <ul style="list-style-type: none"> • Subtipo ABC-like en arrays de expresión génica* • Reordenamiento del gen <i>BCL2</i> • Ausencia de reordenamiento del gen <i>BCL6</i> • Ausencia de mutaciones del gen <i>BCL6</i> • Bajos niveles de mRNA del gen <i>BCL6</i> • Reordenamiento no-IG/ <i>BCL6</i> • Mutaciones en <i>TP53</i> • Ausencia de hipermetilación del promotor de la O-metilguanina DNA metiltransferasa • Perfil de expresión de determinados genes en análisis de microarrays de DNA • Baja expresión de HGAL • Ganancias en la región cromosómica 3p11-p12 <p>* Factores más importantes</p>

CL, mientras que su papel pronóstico en el DLBCL de forma global no está clara (Iqbal *et al.*, 2011; Visco *et al.*, 2013). El papel de *BCL6* como factor pronóstico en el DLBCL es variable en diferentes estudios (Niitsu *et al.*; Jerkeman *et al.*, 2002). La traslocación del gen *MYC* se asocia a un comportamiento más agresivo,

especialmente en aquellos casos en los que se encuentra traslocado conjuntamente con *BCL2* o *BCL6* en forma de linfoma “*doble-hit*” o “*triple-hit*” (Savage *et al.*, 2009; Barrans *et al.*, 2010; Snuderl *et al.*, 2010).

1.2.2. Linfoma de Burkitt (BL)

El linfoma de Burkitt es un linfoma de células B muy agresivo con una capacidad de proliferación muy elevada y que frecuentemente se presenta en localización extranodal o en forma leucémica. Está constituido por células linfoides de tamaño intermedio que proliferan con un patrón “en cielo estrellado”, expresan marcadores inmunofenotípicos propios de linfocito de centro germinal y de forma característica presentan traslocación del gen *MYC*. Según la última clasificación de la WHO, el diagnóstico del BL requiere de la combinación de características clínicas, morfológicas, inmunofenotípicas y moleculares, y ninguna de ellas puede utilizarse como “gold standard” de forma aislada (Swerdlow, 2008).

EPIDEMIOLOGÍA

Se reconocen tres variantes clínicas de BL, con diferencias en la presentación clínica, en la morfología y en las características biológicas (Jaffe, 2011).

- BL endémico: esta variante del BL se da en África ecuatorial, coincidiendo con las regiones en que la malaria es endémica, y en estas áreas representa la neoplasia maligna más frecuente en edad pediátrica. Afecta sobre todo a niños, con un pico de incidencia entre los 4 y los 10 años y existe un discreto predominio masculino (ratio hombres: mujeres de 2:1). La mayoría de los BL endémicos son VEB positivos.

- BL esporádico: esta variante se puede dar en cualquier parte del mundo, y afecta sobre todo a niños y adultos jóvenes. Representa entre el 20 y el 50% de los linfomas pediátricos y en adultos se presenta a una edad media de 30 años, con un predominio masculino (ratio hombres:mujeres de 2:1 ó 3:1). Alrededor del 30% de los casos son VEB positivos, siendo el porcentaje menor en países occidentales.

- BL asociado a inmunodeficiencia: esta variante tiene lugar sobre todo en el contexto de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), representando entre el 30 y el 40% de los linfomas asociados a VIH. Se puede producir en el contexto de otras inmunodeficiencias, como las asociadas al tratamiento inmunosupresor en pacientes trasplantados, si bien en este contexto son mucho menos frecuentes. Alrededor del 25-40% de los casos asociados al VIH son VEB positivos.

ETIOLOGÍA

La etiología del BL no es bien conocida. Se han sugerido como posibles factores etiológicos el VEB, la inmunosupresión ocasionada por la infección persistente de la malaria y el VIH. Estos tres factores etiológicos tendrían un impacto diferente en las tres variantes epidemiológicas de BL, y podrían actuar de forma distinta en su patogénesis (Molyneux *et al.*, 2012).

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

Las características clínicas del BL dependen en gran medida de la variante clínica y de la localización de las lesiones, si bien en todas ellas es frecuente la presencia de masas voluminosas (“bulky”) y alteraciones relacionadas con la alta tasa de replicación de la neoplasia.

- BL endémico: en esta variante es frecuente la afectación extranodal, especialmente de la mandíbula y los huesos de la cara, que suponen aproximadamente el 50% del lugar de presentación. Otras localizaciones frecuentes son el intestino (región íleo-cecal), los ovarios, los riñones, la glándula tiroides, las glándulas salivares y las mamas. La afectación de la médula ósea es infrecuente y no existe afectación de sangre periférica en forma de leucemia.

- BL esporádico: en esta variante los pacientes suelen presentar masas voluminosas abdominales, muchas veces de localización en el íleon terminal, el ciego y el peritoneo. También es frecuente la afectación de los riñones, los ovarios y las mamas, siendo infrecuente la localización en la mandíbula y los huesos de la cara. La médula ósea se encuentra infiltrada con mayor frecuencia que en la variante endémica, y en ocasiones se demuestra la presencia de células neoplásicas circulando en sangre periférica. La presencia de un 25% de células neoplásicas en médula ósea en el momento del diagnóstico define la leucemia de Burkitt o leucemia aguda linfoblástica tipo III (LAL-L3). La afectación del CNS es habitual si no se efectúa un tratamiento profiláctico adecuado.

- BL asociado a inmunodeficiencia: esta variante se presenta habitualmente en estadios avanzados, con afectación extranodal (tracto gastrointestinal, médula ósea y CNS), pero también es frecuente la afectación de los ganglios linfáticos. Suele presentarse en estadios avanzados, y se asocia a recuentos de células CD4 menores a $0.2 \times 10^9/L$, infección por VIH de larga historia no tratada con terapia antirretroviral de alta actividad, y edad inferior a 20 años.

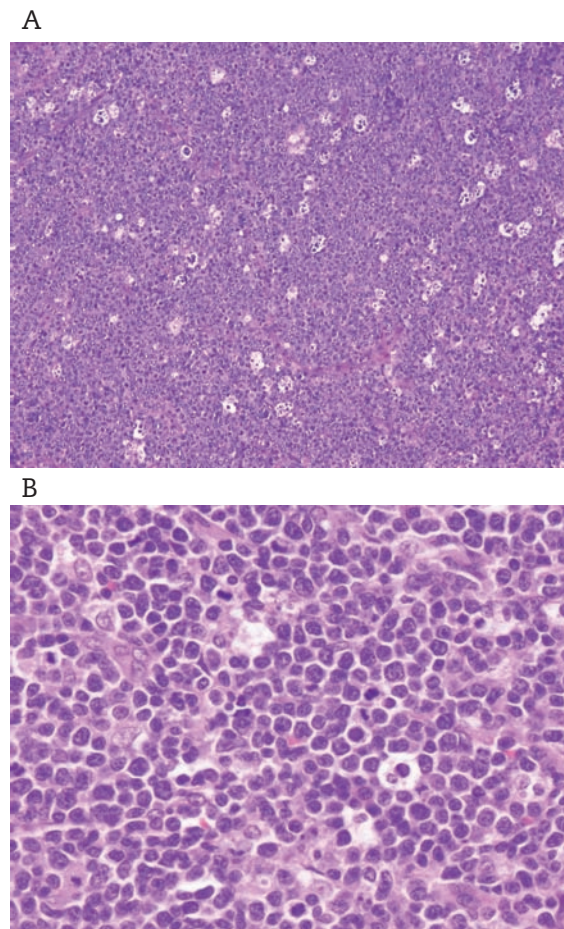
MORFOLOGÍA

Todos los BL endémicos, y la mayor parte de BL esporádicos y BL asociados a inmunodeficiencia comparten unas características morfológicas comunes. Los órganos afectados muestran una arquitectura borrada por una infiltración difusa de linfocitos de tamaño intermedio, entre los que destacan macrófagos que fagocitan detritus celulares, lo que confiere un aspecto en “cielo estrellado”. Las células neoplásicas son uniformes, monótonas, con un núcleo redondeado de cromatina fina en el que se observan varios nucléolos de localización central, y un citoplasma escaso de aspecto basófilo (figura 4). En extensiones citológicas se pueden observar vacuolas lipídicas citoplasmáticas. La presencia de abundantes mitosis y figuras de apoptosis son características constantes. En algunos casos asociados a inmunodeficiencia, las células presentan un núcleo excéntrico, con un único nucléolo central (BL con diferenciación plasmocelular).

INMUNOFENOTIPO

Las células neoplásicas del BL expresan marcadores de línea B (CD19, CD20, CD79, PAX5, etc) e IGM con restricción de cadenas ligeras, siendo negativos los marcadores de línea T. Son positivas para marcadores de centro germinal, como CD10 y BCL6, y también para CD38 y CD43, mientras que CD34 y TdT son negativos. El BCL2 es característicamente negativo, si bien algunos casos expresan BCL2 de forma débil y parcial (figura 5). El índice de proliferación (Ki67) es cercano al 100% de las células neoplásicas. Las características inmunofenotípicas del BL son prácticamente constantes por lo que el diagnóstico de BL en casos con fenotipo atípico (como la positividad para BCL2) requiere que se den el resto de las características, incluyendo la traslocación de *MYC* sin reordenamiento de *BCL2* o *BCL6*.

Figura 4: Aspecto morfológico del BL. (A) Patrón en “cielo estrellado” (H&E x100). (B) Proliferación monótona de células linfoides de tamaño intermedio con cromatina fina y varios nucléolos paranucleares (H&E x400)



CARACTERÍSTICAS GENÉTICAS

La alteración genética característica del BL es la traslocación del gen *MYC*, situado en la banda cromosómica 8q24, que se encuentra en más del 90% de los casos. La traslocación del gen *MYC* se produce habitualmente con el gen de la *IGH* [t(8;14)(q24;q32)], pero también puede tener lugar con los genes de las cadenas ligeras *IGK* e

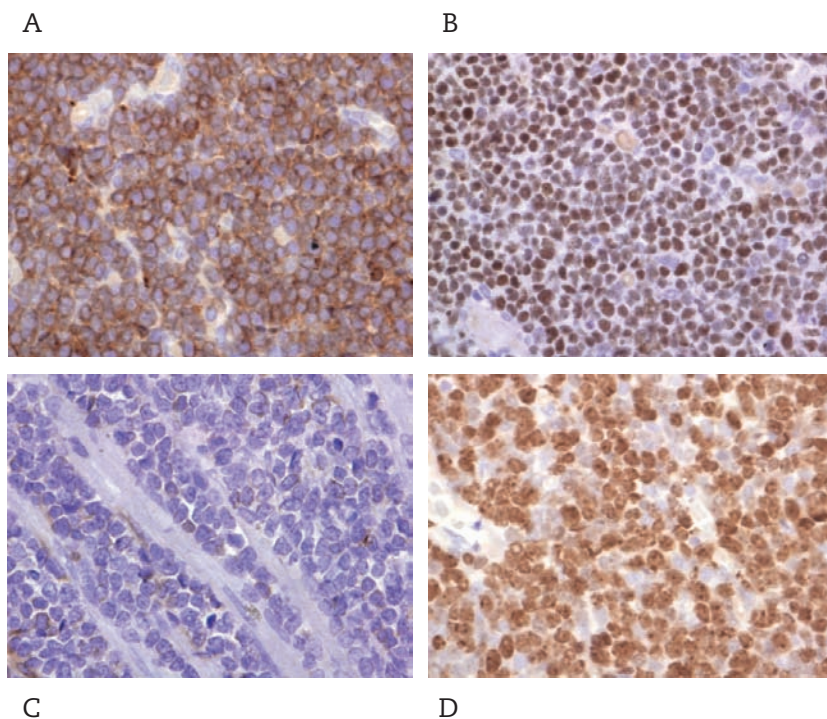


Figura 5.: Inmunofenotipo característico del BL: positividad para CD10 (A) y BCL6 (B), y negatividad para BCL2 (C). El porcentaje de células Ki67 positivas es superior al 95% (D).

IGL [t(2;8)(p12;q24) y t(8;22)(q24;q11.2) respectivamente] en una menor proporción de los casos.

Estudios de expresión génica han demostrado la existencia de una firma genética constante, claramente diferente a la de los DLBCL, si bien algunos casos presentan cierto solapamiento (Dave *et al.*, 2006; Hummel *et al.*, 2006). Recientemente, se han descrito mutaciones recurrentes en los genes TCF3 e ID3 en BL, que contribuyen a la patogénesis de la enfermedad (Richter *et al.*, 2012; Schmitz *et al.*, 2012).

1.2.3. Linfoma de células B, inclasificable, de características intermedias entre DLBCL y BL (BCLU)

El linfoma de células B inclasificable, de características intermedias entre DLBCL y BL (BCLU) es una categoría provisional in-

trducida en la clasificación de la WHO de 2008 (Swerdlow, 2008). En ella se incluyen linfomas agresivos que tienen características morfológicas y genéticas tanto de DLBCL como de BL, pero que por razones biológicas y clínicas no deben encuadrarse en ninguna de estas entidades. Algunos casos han sido diagnosticados con anterioridad como linfoma Burkitt-like, o corresponden a la transformación de un linfoma folicular previo.

Se trata de neoplasias habitualmente constituidas por una combinación de células de tamaño intermedio, similar a las del BL, y de células más grandes que las típicas del BL, similares a las del DLBCL. Con frecuencia existe un índice de proliferación muy elevado y un patrón en “cielo estrellado”. Algunos casos presentan una morfología más típica de BL, pero tienen características inmunofenotípicas o genéticas que excluyen este diagnóstico. No deben incluirse en esta categoría los casos de DLBCLs con

traslocación del gen *MYC* ni los escasos ejemplos de BL típicos en los que no se encuentra la traslocación característica del gen *MYC* (Swerdlow, 2008).

EPIDEMIOLOGÍA

Se trata de linfomas poco frecuentes. La edad media de presentación es elevada, cercana a los 70 años, si bien puede afectar a pacientes de cualquier edad, y afecta a ambos sexos con igual frecuencia (Perry, Anamarija M. *et al.*, 2013).

ETIOLOGÍA

La mayoría de los BCLU se producen de novo, pero como se ha comentado anteriormente, en ocasiones son consecuencia de la transformación o la progresión de un linfoma B de bajo grado, especialmente FLs que sufren una traslocación del gen *MYC* que se añade a la traslocación subyacente de *BCL2*.

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

Más de la mitad de los pacientes se presentan con enfermedad diseminada (estadios III y IV), con afectación extraganglionar frecuente en forma de masas voluminosas (*bulky*), síntomas B, IPI alto y LDH elevada (Perry, Anamarija M. *et al.*, 2013). A diferencia del BL, no existe una predilección por la afectación de la mandíbula y la región íleo-cecal. La médula ósea y la sangre periférica pueden verse afectadas, y algunos casos tienen una presentación en forma de leucemia (Swerdlow, 2008).

MORFOLOGÍA E INMUNOFENOTIPO

El BCLU comparte características morfológicas e inmunofenotípicas con el BL y el DLBCL (tabla 3. Adaptada de Swerdlow, 2008). Los órganos infiltrados muestran una arquitectura borrada por una proliferación neoplásica de células linfoides con frecuen-

Tabla 3. Características morfológicas, inmunofenotípicas y genéticas en el diagnóstico diferencial entre DLBCL y BCLU

Características	BL	Intermedio BL/DLBCL	DLBCL
Morfología			
Únicamente células pequeñas/ medianas	Si	Común	No
Únicamente células grandes	No	No	Común
Mezcla de células pequeñas y grandes	No	En ocasiones	Raro
Proliferación (Ki67/MIB1)			
>90%	Si	Común	Raro
<90%	No	En ocasiones	Común
Expresión BCL2			
Negativo / débil	Si	En ocasiones	En ocasiones
Intenso	No	En ocasiones	En ocasiones
Características genéticas			
Traslocación <i>MYC</i>	Si	Común	Raro
<i>Ig-MYC</i>	Si	En ocasiones	Raro
No <i>Ig-MYC</i>	No	En ocasiones	Raro
Traslocación de <i>BCL2</i> pero no de <i>MYC</i>	No	Raro	En ocasiones
Traslocación de <i>BCL6</i> pero no de <i>MYC</i>	No	Raro	En ocasiones
<i>Double hit</i>	No	En ocasiones	Raro
<i>MYC</i> -Cariotipo simple	Si	Raro	Raro
<i>MYC</i> -Cariotipo complejo	Raro	Común	Raro

tes figuras de mitosis y apoptosis, y macrófagos fagocitando detritus (patrón en “cielo estrellado”). Algunos casos muestran una morfología superponible al BL, con células de tamaño intermedio, con varios nucléolos. En otros casos, se observa una mayor variabilidad en el tamaño y el contorno nuclear del que es habitual en el BL, mostrando características morfológicas intermedias entre el BL y el DLBCL (Swerdlow, 2008).

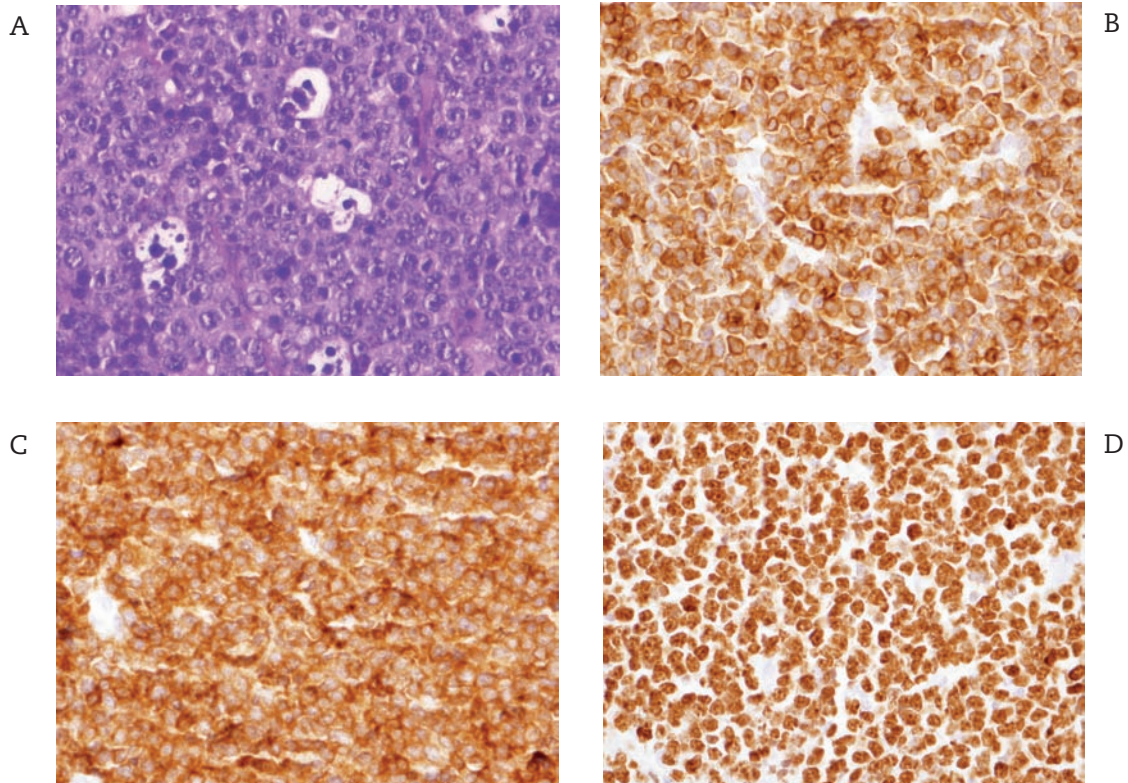
El inmunofenotipo del BCLU suele ser similar al del BL, con expresión de marcadores de línea B (CD20, CD19, CD79, etc) y de marcadores de centro germinal (CD10 y BCL6),

y negatividad para BCL2. La expresión de BCL2 de forma moderada o intensa en casos que por otra parte cumplen criterios de BL justifica su clasificación como BCLU (figura 6). El Ki67 es muy elevado, habitualmente superior al 90%, pero puede ser inferior en algunos casos (Swerdlow, 2008; Perry, Anamarija M. *et al.*, 2013).

CARACTERÍSTICAS GENÉTICAS

La traslocación del gen *MYC* se demuestra en el 35-50% de los casos. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre en el BL, la traslocación afecta con frecuencia a los genes de las cadenas ligeras de las IGs (*IGK* e *IGL*) o a otros

Figura 6: Aspecto morfológico e inmunofenotipo de un caso de BCLU: las células neoplásicas muestran un aspecto variado, con predominio de células intermedias y algunas células grandes con nucléolo central prominente (A). Positividad para CD10 (B) y BCL2 (C) de forma intensa y difusa. El porcentaje de células Ki67 positivas es superior al 90% (D).



genes no relacionados con las IGs. La traslocación del gen *MYC* no se produce de forma aislada, sino que tiene lugar en el contexto de un cariotipo complejo, en el que se asocia en muchos casos a la traslocación de los genes *BCL2* y/o *BCL6* en lo que se denomina linfomas “*doble-hit*” y “*triple-hit*” (Swerdlow, 2008; Perry, Anamarija M. *et al.*, 2013). La traslocación de los genes *BCL2* y *BCL6* de forma aislada, sin reordenamiento del gen *MYC* es poco frecuente. Estudios de expresión génica han demostrado que algunos casos de “*doble-hit*” tienen un perfil génico similar al BL, mientras que otros muestran un perfil génico intermedio entre el BL y el DLBCL (Dave *et al.*, 2006; Hummel *et al.*, 2006).

PRONÓSTICO

El pronóstico de estos linfomas es infausto, especialmente en los linfomas *doble-hit* y *triple-hit*. La tasa de mortalidad es muy elevada y la tasa de respuesta a las terapias actuales es muy baja, incluso con tratamientos intensivos similares a los utilizados en el BL (Li *et al.*, 2013; Perry, Anamarija M. *et al.*, 2013; Petrich, Nabhan e Smith, 2014).

1.2.4. DLBCL primario del sistema nervioso central (CNS-DLBCL)

El DLBCL primario del sistema nervioso central (CNS-DLBCL) es el linfoma que asienta en el cerebro, la médula espinal o las leptomeninges, sin afectación extracerebral en el momento del diagnóstico ni antecedentes de linfomas previos. Se excluyen de esta entidad los linfomas que asientan en la duramadre, los linfomas intravasculares y aquellos que se producen en el contexto de una inmunodeficiencia (Swerdlow, 2008).

EPIDEMIOLOGÍA

El CNS-DLBCL es una enfermedad infrecuente, representando menos del 1% de los linfomas no-Hodgkin. La edad media de presentación se sitúa en la séptima década, y se da con mayor frecuencia en hombres que en mujeres.

ETIOLOGÍA

La etiología del CNS-DLBCL es en buena medida desconocida. En pacientes inmunodeprimidos con frecuencia se demuestra infección por el VEB en las células neoplásicas, mientras que en pacientes inmunocompetentes el VEB suele estar ausente.

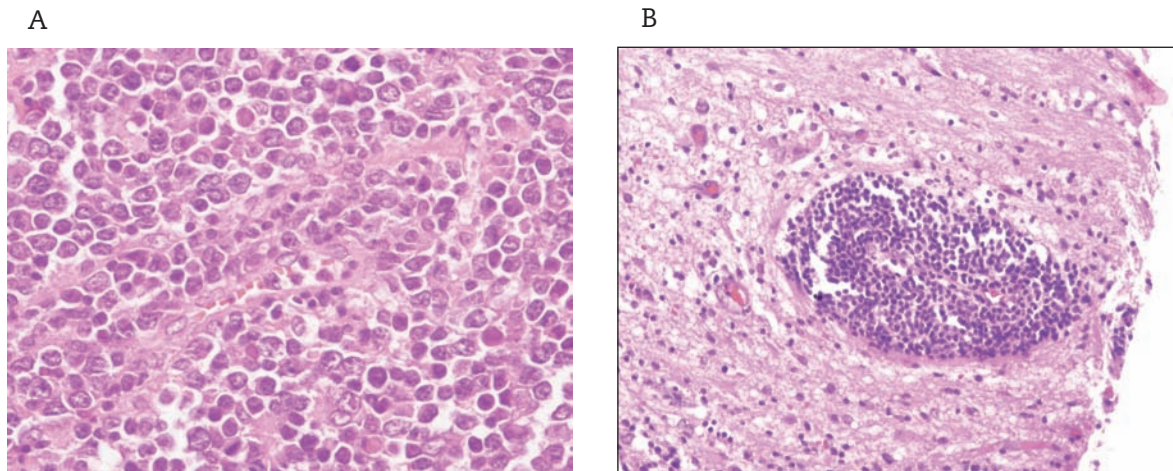
CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

Los pacientes con CNS-DLBCL con frecuencia se presentan con síntomas neurológicos focales, acompañados o no de semiología secundaria al incremento de la presión intracraneal. En el 60-70% de los casos, los estudios de neuroimagen muestran una lesión única, habitualmente de localización supratentorial. Las lesiones suelen ser hipercaptantes, sin necrosis central y con escaso edema peritumoral (Deckert *et al.*, 2011). La afectación de leptomeninges se demuestra en hasta el 15% de los casos cuando se utilizan métodos diagnósticos de alta sensibilidad (Korfel *et al.*, 2012). Aproximadamente el 20% de los pacientes desarrollan afectación intraocular (Deckert *et al.*, 2011).

MORFOLOGÍA

La mayoría de los CNS-DLBCL están compuestos por una proliferación difusa de linfocitos de tamaño grande, de aspecto centroblástico, mezclados con linfocitos pequeños reactivos e histiocitos (figura 7). Es habitual la presencia de áreas de necrosis y de hemorragia, y en pacientes que han recibido tratamiento con corticoides

Figura 7: Imagen histológica de un CNS-DLBCL. El tumor está constituido por células linfoides de aspecto centroblastico que proliferan de forma difusa (A). En la periferia del tumor se identifica el patrón perivascular característico (B).



antes de la toma de la biopsia, la necrosis puede ser de carácter masivo. Con frecuencia puede observarse un patrón de crecimiento perivascular, especialmente en la periferia de la lesión, y puede extenderse a parénquima alejado de la masa tumoral (Ferry, 2011).

INMUNOFENOTIPO

Las células neoplásicas expresan marcadores de diferenciación de línea B (PAX5, CD19, CD20, CD79, etc). El CD10 es positivo en menos del 20% de los casos, mientras que la mayoría (60-80%) son positivos para *BCL6* y prácticamente todos los casos (80-100%) expresan MUM1. Por lo tanto, la mayor parte de los CNS-DLBCL pertenecen al subgrupo inmunofenotípico no-GC-like. El *BCL2* es positivo en un 50-90% de los casos, si bien el criterio para considerar un caso como positivo o negativo no está bien establecido (Bratzen *et al.*, 2003; Camilleri-Broët *et al.*, 2006; Hattab *et al.*, 2010; Brunn *et al.*, 2013).

CARACTERÍSTICAS GENÉTICAS

Desde el punto de vista genético, el CNS-DLBCL se caracteriza por la hipermutación somática de un gran número de genes, entre los que se encuentran *PAX5*, *PIM1*, *MYC*, *RhoH/TTF* y *PRDM1*. Como consecuencia de estas mutaciones genéticas, se produce una activación de importantes vías de señalización como la vía del factor nuclear kappa B (NF-kB), del receptor de las células B (BCR) o de los receptores tipo Toll (*Toll-like receptor*) (Montesinos-Rongen *et al.*, 2004; Deckert *et al.*, 2011; Deckert *et al.*, 2014).

Mediante estudios de hibridación genómica comparativa (CGH) se han demostrado frecuentes ganancias en los cromosomas 12, 18, 22 y 20, y pérdidas en el cromosoma 6q (Weber *et al.*, 2000; Boonstra *et al.*, 2003).

En cuanto a las traslocaciones, el gen *BCL6* se encuentra traslocado con frecuencia, mientras que los reordenamientos de los genes *BCL2* y *MYC* ocurren en raras ocasio-

nes (Montesinos-Rongen *et al.*, 2002; Cady *et al.*, 2008; Brunn *et al.*, 2013).

PRONÓSTICO Y FACTORES PRONÓSTICOS

El CNS-DLBCL es un linfoma agresivo, si bien el pronóstico ha mejorado considerablemente con la introducción de tratamientos con altas dosis de metotrexate. Los factores pronósticos mejor establecidos son la edad y la calidad de vida (“*Performance status*”) medido mediante la escala del grupo oncológico cooperativo del este (ECOG) (Korfel e Schlegel, 2013).

En cuanto a factores pronósticos biológicos individuales, se ha propuesto la traslocación del gen *BCL6*, así como la expresión de la proteína BCL6 y las deleciones del cromosoma 6q, aunque los resultados son contradictorios en diferentes estudios (Braten *et al.*, 2003; Camilleri-Broët *et al.*, 2006; Cady *et al.*, 2008).

1.3. MYC: gen y proteína

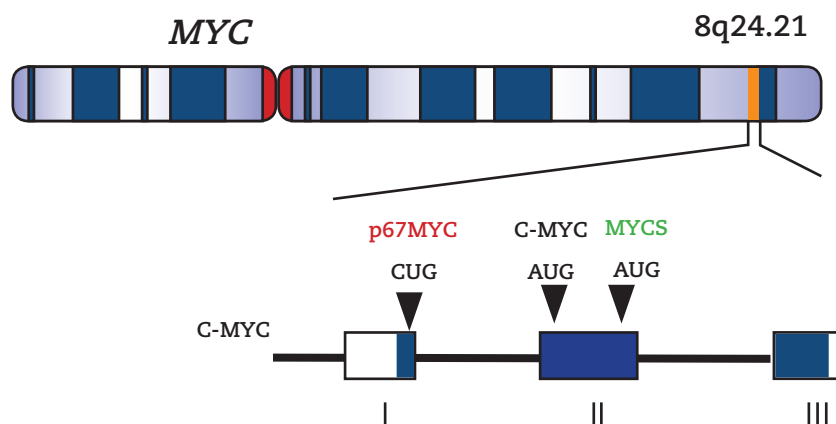
El gen *MYC* (también conocido como *C-MYC*) pertenece a una familia de factores de transcripción en la que se encuentran

los genes *MYCL*, *MYCN*. La identificación del gen *MYC* se remonta a principios de los años 80, cuando fue reconocido como el gen situado en la región 8q24 que se encuentra traslocado en la t(8;14)(q24;q32) del BL (Dalla-Favera *et al.*, 1982). Durante las tres décadas que han transcurrido desde entonces, numerosos estudios han aportado valiosa información sobre la biología del gen *MYC*, si bien todavía existen numerosos interrogantes (Meyer e Penn, 2008; Dang, 2012).

1.3.1. Estructura del gen *MYC*

El gen *MYC*, situado en la banda cromosómica 8q24, consta de tres exones (figura 8). La transcripción comienza habitualmente en un codón AUG del exón II, que junto con el exón III darán lugar a una proteína de 439 aminoácidos (64 KDa). Existen dos codones de inicio alternativos, un codón CUG en el exón I y un segundo codón AUG en el exón II, que darán lugar a dos isoformas minoritarias de 454 y 339 aminoácidos respectivamente (p67MYC y MYCS) (Hann *et al.*, 1988; Spotts *et al.*, 1997).

Figura 8: Estructura del gen *MYC*, con sus exones, codones de inicio e isoformas resultantes.



1.3.2. La proteína MYC

Como se ha comentado, la isoforma mayoritaria de MYC es una proteína de 439 aminoácidos (64 KDa). Se trata de un factor de transcripción que forma parte de la familia de proteínas básicas con motivos hélice-bucle-hélice y cremalleras de leucina (bHLH-LZ, del inglés: *basic helix-loop-helix leucine zipper*).

La secuencia de aminoácidos de la proteína MYC presenta áreas altamente conservadas denominadas cajas MYC (MB, del inglés: *MYC boxes*). Existen 4 cajas MYC: MBI, MBII, MBIII y MBIV, que son importantes en la actividad como activador de la transcripción de la proteína MYC (Meyer e Penn, 2008). MBI y II se encuentran en el extremo N-terminal de la proteína (figura 9). MBI contiene dos aminoácidos importantes en la estabilidad y la actividad de la proteína MYC: una Serina en la posición 62 (Ser62) y una Treonina en la posición 58 (Thr58). La fosforilación de la Ser62 por quinasas específicas estabiliza y activa a MYC, mientras que la posterior fosforilación de la Thr58 favorece su ubiquitinación y posterior degradación (Hann, 2006; Conacci-

Sorrell, McFerrin e Eisenman, 2014). Una vez activada, la proteína MYC tiene una vida media muy corta, por lo que la regulación de su degradación es de vital importancia.

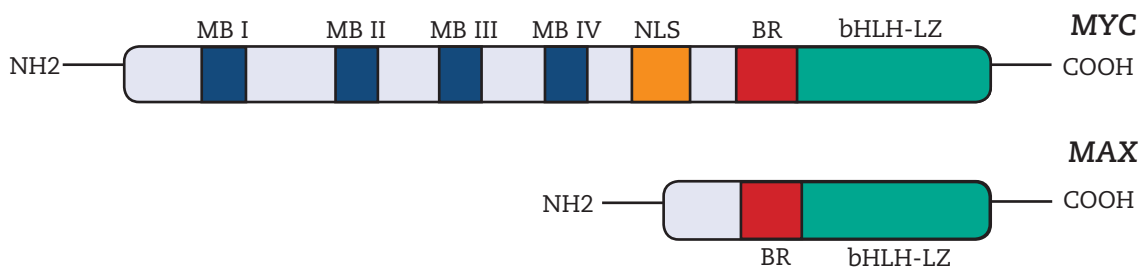
En el segmento intermedio se encuentran las MBIII y IV, y la señal de localización nuclear (NLS, del inglés: *nuclear localization signal*), que indica la localización subcelular de la proteína.

El extremo C-terminal contiene la región básica (BR, del inglés: *basic region*), y los dominios bHLH y LZ. Los dominios bHLH-LZ son el lugar de unión de MYC con la proteína MAX para formar heterodímeros. Los heterodímeros MYC/MAX reconocen, a través del dominio BR, secuencias específicas del DNA conocidas como cajas E (E-boxes), que tienen la estructura 5'-CANNTG-3', habitualmente en forma palindrómica (secuencia 5'-CACGTG-3') (Meyer e Penn, 2008).

RED MYC/MAX/MAD

La formación de heterodímeros MYC/MAX es necesaria para las funciones activadoras de MYC, ya que permite su unión a regiones promotoras de los genes diana, y la activación transcripcional de los mismos. La proteína MAX se encuentra constitutivamente

Figura 9.: Estructura de las proteínas MYC y MAX.



expresada, y en ausencia de MYC forma homodímeros MAX/MAX que no tienen actividad sobre la transcripción de genes diana. En presencia de MYC, los homodímeros MAX/MAX se deshacen y MAX se une a MYC, ya que su afinidad por MYC es mayor que por sí misma. La familia de proteínas MXD (de la que MAD es el principal representante) tiene funciones opuestas a MYC. Por un lado, MAD compete con MYC en su unión con MAX, impidiendo la formación de heterodímeros MYC/MAX. Por otro lado, los heterodímeros MAX/MAD se unen de forma específica a las *E-boxes*, reprimiendo la transcripción de los mismos genes diana que activa MYC (Meyer e Penn, 2008; Dang, 2012; Lüscher, 2012; Conacci-Sorrell, McFerrin e Eisenman, 2014).

1.3.3. Regulación del gen *MYC*

El gen *MYC* se expresa de forma ubicua durante la embriogénesis y en células de tejidos con alta capacidad proliferativa, mientras que su expresión es indetectable en células con diferenciación terminal. La expresión del gen *MYC* se encuentra estrechamente regulada a diferentes niveles, tanto a nivel transcripcional como de estabilidad del mRNA y de activación y degradación de la proteína MYC. El gen *MYC* es el destino final de múltiples vías de transducción de señales, como factores de crecimiento, que se unen al promotor de *MYC* reprimiendo el inicio y la elongación de su transcripción. El mRNA del gen *MYC* tiene una vida media muy corta, por lo que su estabilización o desestabilización por parte de algunos micro-RNA podría también jugar un papel en su actividad. Por último, y como se ha comentado anteriormente, la fosforilación de la Ser62 y la Thr58 en el

dominio MBI, así como los diferentes componentes de la red MYC/MAX/MAD intervienen en la regulación de las funciones de MYC a nivel protéico (Meyer e Penn, 2008; Dang, 2012; Conacci-Sorrell, McFerrin e Eisenman, 2014).

1.3.4. Función del gen *MYC*

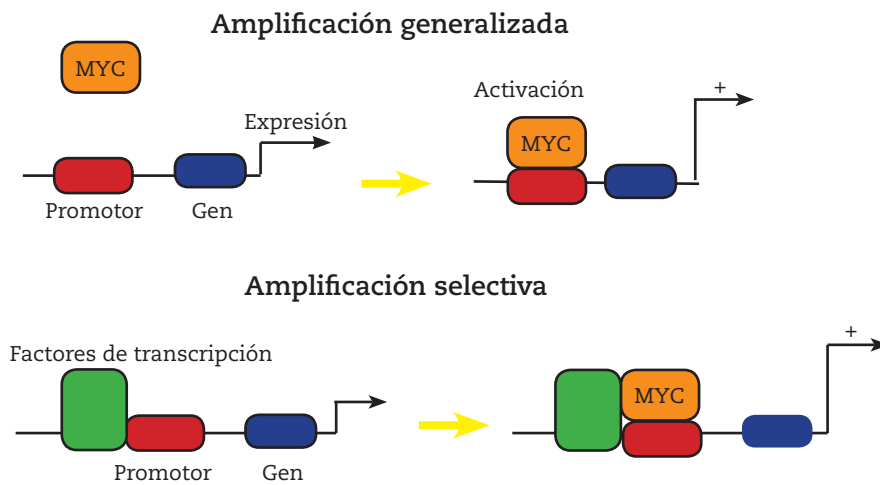
La proteína MYC tiene la capacidad de unirse aproximadamente al 10-15% de todo el genoma, por lo que puede actuar sobre un gran número de genes y de procesos celulares, tanto dependientes de la RNA polimerasa II como de las RNA polimerasas I y III. La actividad de MYC sobre estos genes es principalmente estimulando la transcripción, pero en algunos casos también actúa reprimiéndola, como ocurre con su interacción con MIZ1 (Meyer e Penn, 2008; Campbell e White, 2014; Conacci-Sorrell, McFerrin e Eisenman, 2014).

Entre las funciones del gen *MYC* destacan la regulación de la proliferación, la diferenciación, y el crecimiento celular, la síntesis y la apoptosis. Así, el gen *MYC* promueve la progresión de la fase G0/G1 a la fase S del ciclo celular, a través de la activación de la transcripción de factores de regulación del ciclo celular (como Ciclina D1, CDK4 o E2F1) y la inhibición de inhibidores de quinasa dependientes de ciclina (CDKs, del inglés: *cyclin-dependent kinase*) como p21. En cuanto a la apoptosis, el gen *MYC* actúa estabilizando la proteína proapoptótica p53, y de forma indirecta, inhibe proteínas antiapoptóticas como BCL2 (Meyer e Penn, 2008). Respecto a la diferenciación celular, se ha visto que la regulación negativa de *MYC* es necesaria para la salida de la célula del ciclo celular y su posterior diferenciación. Así

por ejemplo, la expresión elevada de MYC (estimulada por IRF4) en determinadas células de la zona clara del centro germinal, conlleva su reentrada en la zona oscura y posterior proliferación, mientras que aquellas que son MYC negativas podrían salir

global, enfatizando que el gen *MYC* puede activar firmas genéticas específicas, probablemente a través de otros factores de transcripción (Sabò *et al.*, 2014; Walz *et al.*, 2014) (figura 10).

Figura 10: Mecanismos de actuación del gen *MYC*. Arriba: estimulación general de los genes activos de una célula determinada. Abajo: estimulación selectiva de determinados genes. Adaptado de Karube, 2015.

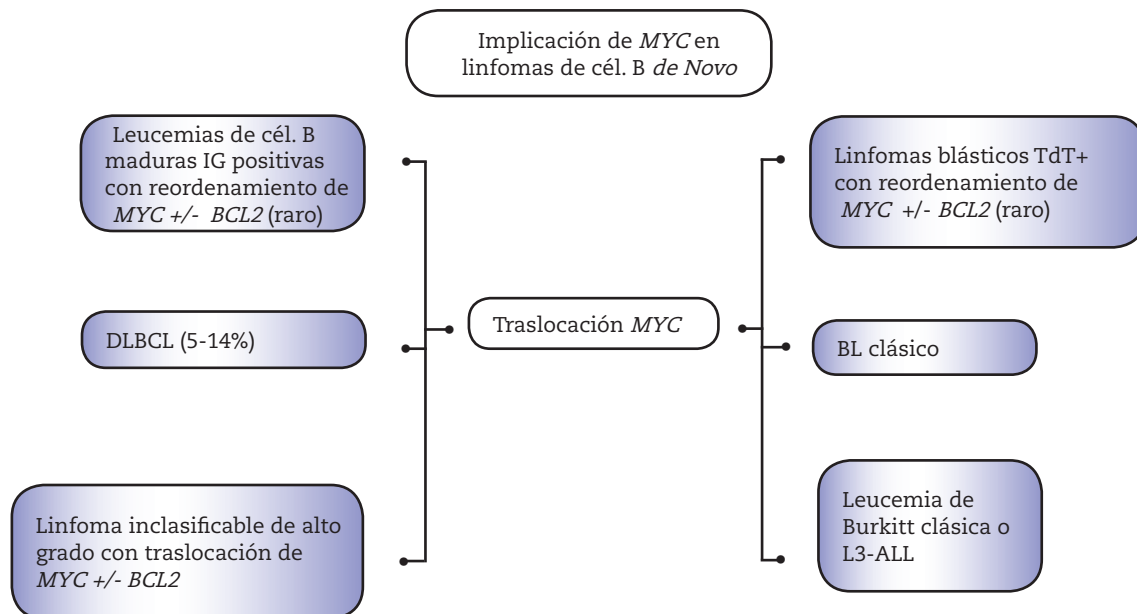


del centro germinal para diferenciarse a células de memoria o a plasmablastos tempranos (Ott, Rosenwald e Campo, 2013).

Se ha sugerido que el gen *MYC*, en lugar de activar una firma genética concreta, actuaría como amplificador de la transcripción, estimulando únicamente la transcripción de los genes activos de una determinada célula. De esta forma, estimularía el programa de transcripción preexistente, sin actuar sobre genes silenciados (Lin, C. Y. *et al.*, 2012; Nie *et al.*, 2012). Estudios recientes cuestionan este modelo de amplificación

1.4. Desregulación del gen *MYC* en linfomas B agresivos

La desregulación del gen *MYC* es el principal mecanismo etiopatogénico del BL, pero también está implicado, si bien en menor medida, en otros procesos linfoproliferativos como el DLBCL, el BCLU, el Linfoma plasmablasto, las neoplasias de células plasmáticas, el Linfoma linfoblástico TdT positivo, el DLBCL ALK+ y algunas leucemias de células B maduras (figura 11) (Jaffe, 2011; Ott, Rosenwald e Campo, 2013).

Figura 11: Reordenamiento del gen *MYC* en linfomas B *de novo* (Adaptada de Jaffe, 2011).

La traslocación génica fue el primer mecanismo descrito en la desregulación del gen *MYC*, pero la sobreexpresión puede obedecer a otros mecanismos como la amplificación o ganancia de copias, la presencia de mutaciones o la activación por mecanismos indirectos. En la tabla 4 quedan resumidos los mecanismos implicados en algunos de estos linfomas (Ott, Rosenwald e Campo, 2013; Karube e Campo, 2015).

Por otro lado, el reordenamiento del gen *MYC* puede tener lugar como un proceso secundario, siendo el mecanismo implicado en la transformación de algunos linfomas B indolentes en linfomas B agresivos. Este mecanismo ha sido descrito en linfomas foliculares, linfomas de células del manto, linfomas marginales esplénicos y en neoplasias de células plasmáticas.

La presente tesis se centra, en sus dos primeros trabajos, en DLBCL, BL y BCLU, y en el último trabajo explora las características de un subtipo concreto de DLBCL: el linfo-

ma difuso de células grandes B primario del sistema nervioso central (CNS-DLBCL).

1.4.1 *MYC* en el linfoma de Burkitt (BL)

La traslocación del gen *MYC* fue inicialmente reconocida en el BL, al demostrar que es el gen situado en la región 8q24 responsable de la t(8;14)(q24;q32), característica de este linfoma (Dalla-Favera *et al.*, 1982). El reordenamiento de *MYC* en el BL clásico se produce mayoritariamente (hasta en el 70-80% de los casos) con el gen de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas (*IGH*), dando lugar a la t(8;14)(q24;q32). En el 20% de casos restantes, el reordenamiento del gen *MYC* afecta a los genes de las cadenas ligeras kappa y lambda (*IGK* e *IGL*), en forma de t(2;8)(p12;q24) y t(8;22)(q24;q11.2) respectivamente.

Los puntos de ruptura en la región 8q24 varían considerablemente en función del gen compañero (*partner*) que participe en

Tabla 4: Mecanismos de desregulación de MYC en linfomas B agresivos. Adaptada de Karube, 2015.

	DLBCL	BL	BCLU	DLBCL ALK+	Linfoma Plasmablástico
Principal mecanismo de desregulación de MYC	Traslocación amplificación	Traslocación	Traslocación	Activación por STAT3	Traslocación
Traslocación de MYC	5% a 14%	90% a 100%	35% a 50%	0%	41% a 49%
Ganancia de copias/ amplificación de MYC	21% a 38%	Muy raro	Sin datos	50%	20%
Partners de traslocación de MYC	A menudo no-IG (35-53%)	IG (100%)	A menudo no-IG (38%)	-	IG (83%, no-IG (17%))
Taslocación concurrente de BCL2	Frecuente (58% a 83%)	0%	47%	-	Sin datos
Cariotipo	Complejo	Simple	Complejo	Complejo	Sin datos
Expresión de MYC	29% a 47%	100%	35%	100%	Sin datos

el reordenamiento. En la traslocación t(8;14) (q24;q32) clásica, el punto de ruptura en el cromosoma 8 se encuentra habitualmente en posición 5' (centromérica) respecto al gen MYC. Estos puntos de ruptura en posición 5' se agrupan en tres regiones diferentes, que permiten clasificar las traslocaciones 5' en clase I, clase II y clase III. En las traslocaciones de clase I, el punto de ruptura se sitúa en el primer exón o el primer intrón del gen MYC. En las traslocaciones de clase II el punto de ruptura se sitúa inmediatamente anterior (5') al gen MYC, mientras que en las traslocaciones de clase III el punto de ruptura se sitúa en posición más distante (5') del gen MYC. En ocasiones, las traslocaciones de clase III se producen a gran distancia (varias megabases) del gen MYC en dirección centromérica. Las

traslocaciones de clase I y clase II son predominantes en los BL esporádicos y en los asociados a inmunodeficiencia, mientras que las de clase III predominan en el BL endémico (Joos, Falk, *et al.*, 1992; Joos, Haluska, *et al.*, 1992; Busch *et al.*, 2007).

Respecto a las traslocaciones variantes, que afectan a los genes IGK o IGL [t(2;8)(p12;q24) y t(8;22)(q24;q11.2) respectivamente] el punto de ruptura en el cromosoma 8 se sitúa de forma constante en la región 3' (telomérica) del gen MYC. Se describen dos regiones donde se concentran la mayor parte de los puntos de ruptura 3': la región variante de Burkitt tipo 1 (BVR1, del inglés: *Burkitt variant region 1*) y la región variante de Burkitt tipo 2 (BVR2, del inglés: *Burkitt variant region 2*). En algunas ocasiones, el punto de

ruptura en estas traslocaciones variantes se sitúa varias megabases en sentido telomérico (figura 12) (Henglein *et al.*, 1989; Eirneron *et al.*, 2006).

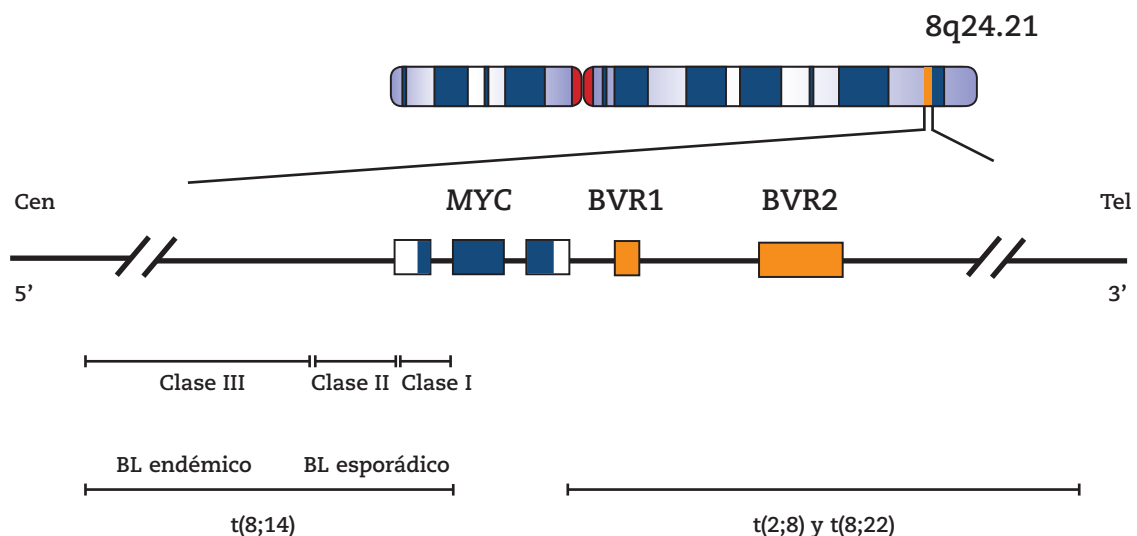
El reordenamiento del gen *MYC* en el BL se produce en el contexto de un cariotipo simple, es decir, con pocas alteraciones citogenéticas adicionales o como alteración única. En estudios mediante hibridación genómica comparada (CGH, del inglés: *comparative genomic hybridization*) más de la mitad de los casos presentan la traslocación de *MYC* de forma aislada, siendo las alteraciones secundarias más frecuentes ganancias en los cromosomas 1p, 7 y 12 o pérdidas en los cromosomas 6q, 13q y 17p (Toujani *et al.*, 2009).

La traslocación del gen *MYC*, independientemente del *partner* gen compañero implicado en la misma, conlleva su desregulación y sobreexpresión, y constituye el

principal mecanismo etiopatogénico de la enfermedad. Sin embargo, en hasta el 10% de los BL no es posible demostrar reordenamiento del gen *MYC* que justifique su sobreexpresión. Estudios de expresión génica han demostrado la existencia de una firma genética constante en los BL, que es diferente a la de los DLBCL (Dave *et al.*, 2006; Hummel *et al.*, 2006). En algunos de estos linfomas con firma genética de BL no se pudo demostrar traslocación del gen *MYC*. Por lo tanto, otros mecanismos alternativos al reordenamiento genético podrían estar implicados en la desregulación de *MYC* en estos casos. Algunos autores han propuesto que una desregulación de la expresión de algunos miRNA podría contribuir en la patogenia de la enfermedad en los casos sin reordenamiento de *MYC* (Leucci *et al.*, 2008).

Las mutaciones constituyen un mecanismo adicional que contribuye a la desregulación del gen *MYC* en el BL. Las mutaciones del

Figura 12: Región 8q24, gen *MYC* y principales puntos de ruptura en el BL.



gen *MYC* se producen en hasta el 60% de los casos, especialmente en el BL endémico con la t(8;14). La mayor parte de estas mutaciones se producen en dominios funcionantes del gen, y pueden actuar sobre la transcripción del mismo, su actividad o su estabilidad (Salghetti, Kim e Tansey, 1999; Thomas e Tansey, 2011). A modo de ejemplo, algunas mutaciones afectan a la Ser62 o a la Thr58, que como se ha mencionado anteriormente tienen una función importante en la estabilidad y en la degradación de MYC (ver apartado 1.3.2).

En el primer trabajo de esta tesis, y en otros trabajos recientes, se ha podido demostrar que la sobreexpresión de la proteína MYC resultante de estos mecanismos de desregulación se puede objetivar mediante técnicas inmunohistoquímicas (Ruzinova, Caron e Rodig, 2010; Tapia *et al.*, 2011).

1.4.2. MYC en el linfoma difuso de células grandes B (DLBCL)

Las alteraciones del gen *MYC* en el DLBCL incluyen traslocaciones, amplificaciones / ganancia de copias y mutaciones, además de mecanismos de activación indirectos.

La traslocación del gen *MYC* se encuentra en el 5-14% de los casos de DLBCL. El reordenamiento se produce en muchos casos con el gen *IGH* en forma de t(8;14)(q24;q32) clásica del BL, pero también con los genes *IGK* e *IGL*, en mayor frecuencia a la observada en el BL. En el 35-50% de los casos, el *MYC* se encuentra reordenado con un gen no-IG, cosa que no ocurre en el BL (Hummel *et al.*, 2006; Savage *et al.*, 2009; Barrans *et al.*, 2010).

Los puntos de ruptura en la región 8q24, como se ha mencionado en el BL (apartado 1.4.1), varían considerablemente en función del *partner*. Cuando el reordenamiento afecta al gen de la *IGH*, el punto de ruptura se sitúa en la región 5' (centromérica) respecto al gen *MYC*, mientras que en las traslocaciones que interesan a los genes *IGK* o *IGL*, el punto de ruptura se sitúa en la región 3' (telomérica). Las traslocaciones que afectan a genes no-IG se producen mayoritariamente en localización 3' respecto al gen *MYC*, y en ocasiones se sitúan muy alejadas del mismo (Bertrand *et al.*, 2007). Estos reordenamientos no-IG con frecuencia afectan a genes con funciones importantes en la linfomagénesis, como *BCL6* [t(3;8)] y *PAX5* [t(8;9)] (Bertrand *et al.*, 2007; Aukema *et al.*, 2014).

En el DLBCL, las traslocaciones del gen *MYC* se producen en muchos casos en el contexto de un cariotipo complejo, en el que con frecuencia se añaden reordenamientos de otros genes como *BCL2* o *BCL6*. Estos linfomas son conocidos como linfomas “*doble-hit*” cuando se encuentran reordenados *MYC* y *BCL2* o *BCL6* o “*triple-hit*” cuando los tres genes se encuentran reordenados (Savage *et al.*, 2009; Barrans *et al.*, 2010; Snuderl *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2013).

La presencia de reordenamiento del gen *MYC* se han relacionado con un peor pronóstico, tanto en la era pre-Rituximab como en la post-Rituximab. Este comportamiento más agresivo se ve influenciado en gran medida por el elevado porcentaje de casos en los que el reordenamiento del gen *MYC* se acompaña de reordenamientos en los genes *BCL2* y/o *BCL6* (Johnson *et al.*, 2009; Savage *et al.*, 2009; Barrans *et al.*, 2010; Snuderl *et al.*, 2010). En la práctica clínica diaria, el comportamiento tan agresivo de

estas neoplasias y su baja tasa de respuesta al tratamiento estándar con R-CHOP, hacen que el estudio del reordenamiento de los genes *MYC*, *BCL2* y *BCL6* sea obligatorio en el momento del diagnóstico.

Las amplificaciones (definidas como la presencia de más de 4 copias del gen) y las ganancias de copias (definidas como la presencia de 3-4 copias del gen) se objetivan en el 2% y el 20-40% de los casos respectivamente. El aumento de número de copias del gen se correlaciona con unos niveles elevados de mRNA, si bien el papel pronóstico de estas amplificaciones no está bien establecido (Stasik *et al.*, 2010; Valera *et al.*, 2013).

Las mutaciones en el gen *MYC*, han sido descritas hasta en un tercio de los DLBCL. Estas mutaciones, como en el caso del BL (ver apartado 1.4.1) afectan a regiones funcionantes del gen, por lo que pueden interferir en su actividad, estabilidad o degradación (Pasqualucci *et al.*, 2001).

Como se ha comentado, la presencia de reordenamientos, amplificaciones / ganancia de copias y mutaciones, tienen una influencia sobre la transcripción, estabilidad y degradación de la proteína MYC. En el primer trabajo de la presente tesis y en otros trabajos publicados recientemente, se ha demostrado que los linfomas con reordenamiento del gen *MYC* tienen una expresión de la proteína MYC más elevada, que puede objetivarse mediante técnicas inmunohistoquímicas en tejido parafinado (Ruzinova, Caron e Rodig, 2010; Tapia *et al.*, 2011; Green, Nielsen, *et al.*, 2012). Sin embargo, en un porcentaje variable de DLBCLs sin traslocación del gen *MYC* se observan niveles elevados de expresión de la proteína MYC. Algunos trabajos recientes han demostrado que la expresión de niveles elevados de la

proteína MYC, se asocia a un peor pronóstico, especialmente cuando se encuentra co-expresado con *BCL2* (Green, Young, *et al.*, 2012; Johnson *et al.*, 2012; Hu *et al.*, 2013; Valera *et al.*, 2013).

1.4.3. *MYC* en el linfoma de células B, inclasificable, de características intermedias entre DLBCL y BL (BCLU)

El gen *MYC* se encuentra reordenado en el 35-50% de los BCLU, y a diferencia de lo que ocurre en el BL, el reordenamiento frecuentemente se produce con genes no-IG (hasta en la mitad de los casos). Los puntos de ruptura en la región 8q24 se localizan con frecuencia en la región 3' (telomérica), de forma similar a lo que ocurre con las traslocaciones variantes con las cadenas ligeras kappa y lambda (Dave *et al.*, 2006; Hummel *et al.*, 2006; Ott, Rosenwald e Campo, 2013).

Las traslocaciones del gen *MYC* en el BCLU se producen en el contexto de un cariotipo complejo, y en aproximadamente la mitad de los casos se asocian a reordenamientos de *BCL2* o, en menor frecuencia, de *BCL6*, en forma de linfomas “*doble-hit*” y “*triple-hit*” (Lin, P. *et al.*, 2012; Perry, A. M. *et al.*, 2013). Como se ha comentado en el DLBCL éstas se asocian a un peor pronóstico, (ver apartado 1.4.2).

La presencia de amplificaciones / ganancia de copias del gen *MYC* ha sido raramente estudiada en el BCLU. Los escasos datos reportados parecen indicar que se trata de una alteración poco frecuente, que ocurriría en aproximadamente el 5% de los casos (Lin, P. *et al.*, 2012; Perry, A. M. *et al.*, 2013). Finalmente, se desconoce el porcentaje de casos de BCLU en los que el gen *MYC* se encuentra mutado.

1.4.4. MYC en el DLBCL primario del sistema nervioso central (CNS-DLBCL)

La presencia de traslocaciones del gen *MYC* ha sido escasamente estudiada en el CNS-DLBCL. Los datos disponibles indican que se trataría de una alteración muy infrecuente que se objetiva entre el 0 y el 2% de los CNS-DLBCL (Montesinos-Rongen *et al.*, 2002; Cady *et al.*, 2008; Hattab *et al.*, 2010). Con mayor frecuencia se producen hipermutaciones somáticas en el gen *MYC*, presentes en hasta el 60% de los casos. Estas mutaciones afectan principalmente al exón I y al intrón I (Montesinos-Rongen *et al.*, 2004). No existen datos respecto a la presencia o no de amplificaciones / ganancia de copias del gen *MYC* en el CNS-DLBCL.

Por lo que respecta a la expresión de la proteína MYC en el CNS-DLBCL, no se dispone de datos previos al inicio de la presente tesis. No obstante, la presencia de niveles elevados de mRNA del gen *MYC* encontrada en algunos trabajos, apunta a que podría haber una elevada expresión proteica, independiente de la presencia de traslocaciones (Rubenstein *et al.*, 2006). Un trabajo publicado recientemente objetivó la presencia de niveles altos de miRNA relacionados con *MYC* en el CNS-DLBCL en comparación con DLBCL nodales, que podrían justificar, al menos en parte, una sobreexpresión del gen *MYC* (Fischer *et al.*, 2011).

1.5. Métodos de estudio de las traslocaciones del gen MYC

El estudio de las traslocaciones del gen *MYC*, así como de otros genes implicados en la etiopatogenia y el pronóstico de los procesos linfoproliferativos, puede abor-

darse mediante diferentes técnicas. En la práctica rutinaria, las técnicas que tienen mayor implantación son la citogenética convencional y la hibridación in situ fluorescente (FISH). La citogenética convencional permite establecer un cariotipo completo de las células neoplásicas, y no sólo de un único gen determinado, por lo que aporta una información muy valiosa. Se trata además de una técnica económica y sencilla de realizar. Sin embargo, la citogenética convencional adolece de importantes inconvenientes. En primer lugar, requiere de células neoplásicas en división por lo que sólo puede realizarse si se dispone de tejido en fresco, mientras que la disponibilidad de escaso tejido y su fijación en formaldehído son lo habitual en el diagnóstico rutinario de las neoplasias linfoides agresivas. Por este mismo motivo, tampoco es posible utilizarla en estudios retrospectivos. Además, se trata de una técnica de baja sensibilidad, y no permite realizar correlación con la morfología y la arquitectura tisular (Dunphy e Cagle, 2010).

En cambio, la técnica de FISH puede realizarse en células en interfase procedentes de tejido fijado en formol y parafinado (además de muestras citológicas, tejido congelado o células en metafase), requiere muy escaso tejido y tiene una alta sensibilidad. Además, permite analizar un gran número de células, realizar una correlación morfológico-arquitectural y estudiar casos de forma retrospectiva. Por todo ello, la FISH se ha ido convirtiendo en una técnica habitual en el estudio del reordenamiento génico durante el proceso diagnóstico de los procesos linfoproliferativos, tanto del gen *MYC* como de otros genes como *BCL2* o *BCL6*. La disponibilidad de sondas comerciales y la estandarización del procedimiento técnico también han contribuido a la implementa-

ción de la FISH en los laboratorios de anatomía patológica (Dunphy e Cagle, 2010).

Existen dos estrategias diferentes a la hora de estudiar reordenamientos mediante la técnica de FISH, cada una con un tipo de sonda de *locus* específico diferente: las sondas de doble fusión o colocalización (en inglés: *dual fusión*) y las sondas de separación (en inglés: *split o break-apart*).

1.5.1.- FISH con sondas de fusión o colocalización

El estudio FISH con sondas de fusión o colocalización se basa en el empleo de una sonda específica de *locus* para cada uno de los *loci* involucrados en la traslocación. Cada una de las sondas está marcada con un fluorocromo diferente; habitualmente una de color rojo y otra de color verde, con diferentes picos de absorción. Las sondas de fusión están diseñadas de forma que se extienden a ambos lados de los puntos de rotura más frecuentes. A las dos sondas específica de *locus* se puede añadir una sonda centromérica del cromosoma en estudio (cromosoma 8 en el caso de *MYC*), de color azul. Esta sonda centromérica permite evaluar el número de cromosomas donde se sitúa el gen en estudio, y por lo tanto valorar la existencia de ganancia de copias / amplificaciones.

En una célula normal, en el estudio mediante sondas FISH de fusión se observarán dos señales verdes y dos señales rojas, correspondientes a los dos pares génicos en estudio (patrón 2R2G). En cambio, cuando la célula ha sufrido un reordenamiento de los genes en estudio, se observarán señales de fusión verde-roja (o amarilla, resultante de la superposición de ambas señales). Si se

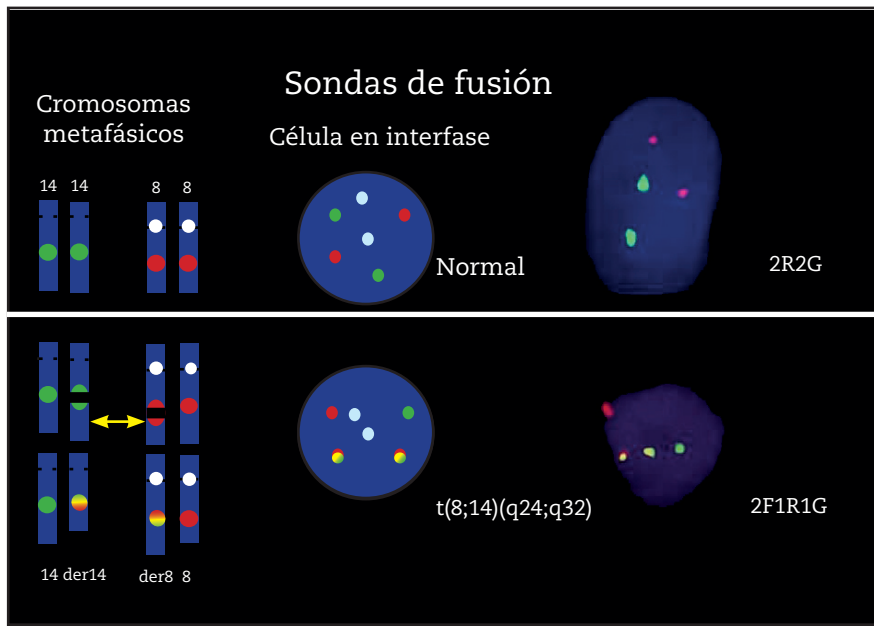
trata de una traslocación recíproca, se observará una señal verde y una roja, correspondientes a los dos alelos preservados, y dos señales de fusión, correspondientes a los dos cromosomas derivativos (patrón 2F1R1G). En caso de pérdida de uno de los cromosomas derivativos, puede observarse una única señal de fusión, junto a la señal verde y roja de los alelos preservados (patrón 1F1R1G) (figura 13).

Las sondas de fusión o colocalización requieren el conocimiento previo de los dos genes implicados en una traslocación determinada, lo que aporta a la vez una ventaja y un inconveniente respecto a las sondas de separación: permiten evaluar un reordenamiento concreto y específico [t(8;14)(q24;q32) en el caso del gen *MYC*], pero dan lugar a falsos negativos o resultados equívocos cuando el reordenamiento se produce con un gen compañero o *partner* diferente al estudiado [t(2;8)(p12;q24), t(8;22)(q24;q11.2) o t(8;?)(q24;?) en el caso del gen *MYC*]. Por otro lado, pueden producirse falsos positivos debido a la superposición al azar de dos señales verde y roja, por lo que es importante establecer puntos de corte a la hora de valorarlas (Ventura *et al.*, 2006). Estas sondas son especialmente útiles cuando el reordenamiento se produce de forma casi constante entre dos genes concretos conocidos.

1.5.2.- FISH con sondas de separación

El estudio FISH con sondas de separación (en inglés: *split o break-apart*) se basa en el empleo de dos sondas específicas de *locus* que flanquean el punto de ruptura del gen en estudio. Así, una de las sondas va dirigida contra la región del DNA que se extien-

Figura 13: Representación esquemática de la FISH mediante sondas de fusión o de colocalización.



de desde el punto de ruptura hacia el centrómero y la otra contra la región entre el punto de ruptura y el telómero. Como se ha descrito en las sondas de fusión, cada una de las sondas está marcada con un fluorocromo diferente; que suelen ser una de color rojo (Spectrum Orange), y otra de color verde (Spectrum Green) con picos de absorción diferentes.

En una célula normal, en el estudio mediante sondas FISH de separación se observarán dos señales roja-verde (o amarilla), correspondientes a los dos alelos no reordenados del gen en estudio (patrón 2F). En cambio, cuando la célula ha sufrido un reordenamiento del gen en estudio, se observará una separación de las señales verde y roja (Split). Si se trata de una traslocación recíproca, se observará una señal

fusionada verde-roja (o amarilla) correspondiente al alelo no reordenado, y dos señales de separación verde y roja, correspondientes a los dos cromosomas derivados (patrón 1F1R1G). En caso de pérdida de uno de los cromosomas derivados, puede observarse una única señal roja o verde, junto a la señal fusionada del alelo preservado (patrón 1F1R o 1F1G (figura 14).

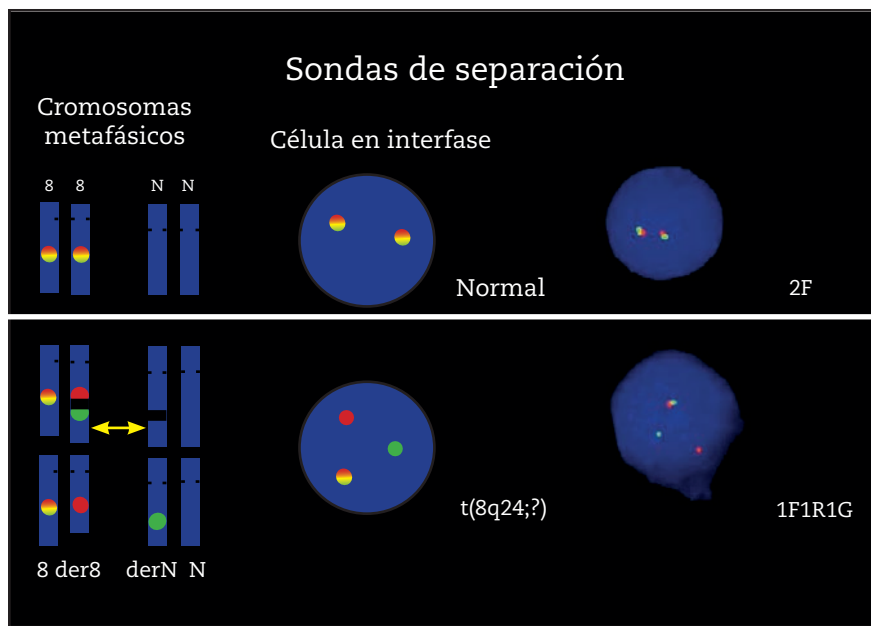
Las sondas de separación tienen la ventaja de que permiten detectar reordenamientos del gen en estudio, con independencia del *partner* implicado [t(8;?) (q24;?) en el caso del gen *MYC*]. Además, evitan la posibilidad de falsos positivos debidos a la superposición nuclear. En contrapartida, tienen el inconveniente de que no permiten determinar el segundo gen implicado o *partner*. Por lo tanto, estas sondas son especialmen-

te útiles cuando el gen en estudio sufre reordenamientos con diferentes *partners* (Ventura *et al.*, 2006; Dunphy e Cagle, 2010).

Dada la importancia de la evaluación del reordenamiento del gen *MYC* y de otros genes en el proceso diagnóstico así como en

la evaluación pronóstica de los linfomas agresivos, es de vital importancia conocer las características de la técnica utilizada (sondas de fusión vs. sondas de separación), en especial en cuanto a su sensibilidad y especificidad, ventajas y limitaciones. Ello motivó el segundo trabajo de la presente tesis.

Figura 14: Representación esquemática de la FISH mediante sondas de separación.



2. Hipótesis



2. Hipótesis

La presencia de traslocaciones del gen *MYC* en el linfoma de Burkitt es bien conocida, y forma parte esencial de la patogenia de la enfermedad. En otros linfomas agresivos, como el DLBCL y BCLU, también pueden detectarse alteraciones en el gen *MYC*, asociadas o no a alteraciones en otros genes como *BCL2* o *BCL6*. Estas alteraciones pueden influir en la expresión de los genes afectados y determinar la patogenia y/o comportamiento de la enfermedad. Por ello, es de vital importancia el estudio de la presencia o no de alteraciones del gen *MYC* en el diagnóstico y valoración pronóstica de los linfomas agresivos, así como valorar su influencia sobre la expresión del gen. Sobre estas premisas nos planteamos las siguientes hipótesis:

- a) La presencia de traslocación y/o amplificación/ganancia de copias del gen *MYC* influye en la expresión proteica, que puede ser evaluada mediante estudio inmunohistoquímico (trabajo 1).
- b) La expresión del gen *MYC* en linfomas agresivos no se relaciona con las características morfológicas, inmunofenotípicas, el subtipo molecular (determinado mediante el algoritmo de Hans) ni el índice de proliferación (trabajo 1).
- c) El estudio de la traslocación de *MYC* mediante diferentes sondas de FISH puede dar lugar a resultados discordantes. El diseño de las sondas de FISH influye sobre su sensibilidad en la detección de traslocaciones del gen *MYC*, dada la gran variabilidad de puntos de ruptura descritos en la banda cromosómica 8q24 (trabajo 2).
- d) El CNS-DLBCL es una neoplasia muy agresiva en la que las alteraciones en los genes *MYC*, *BCL2* y *BCL6* pueden estar presentes, y podrían tener repercusiones en el comportamiento de la enfermedad, de forma similar a lo que ocurre en los DLBCL sistémicos (trabajo 3).
- e) La expresión de los genes *MYC* y *BCL2* y en el CNS-DLBCL, relacionada o no a alteraciones genéticas, puede determinarse mediante técnicas inmunohistoquímicas y podría influir en el comportamiento de la enfermedad (trabajo 3).

3. Objetivos



3. Objetivos

El objetivo principal de la presente tesis es estudiar la implicación del gen *MYC* en linfomas B agresivos, analizando la presencia de alteraciones génicas (traslocación y/o ganancia de copias) mediante técnicas de hibridación in situ fluorescente, y la expresión proteica mediante técnicas inmunohistoquímicas, y valorar su papel pronóstico en una serie de CNS-DLBCL.

Los objetivos específicos son los siguientes:

- a) Evaluar si existe una correlación entre la expresión proteica del gen *MYC*, determinada mediante técnicas inmunohistoquímicas, y la presencia o no de alteraciones (traslocaciones y/o ganancia de copias) a nivel genético en linfomas B agresivos (trabajo 1).
- b) Determinar si la presencia de alteraciones del gen *MYC* y/o la expresión de niveles elevados de la proteína *MYC* se asocian o no al perfil inmunohistoquímico (*CD10*, *BCL6*, *BCL2* y *MUM1*), subtipo molecular (algoritmo de Hans) o índice de proliferación (*Ki67*) del linfoma (trabajo 1).
- c) Comparar los resultados obtenidos mediante diferentes sondas de hibridación in situ fluorescente (FISH) en el estudio de las alteraciones del gen *MYC* (trabajo 2).
- d) Estudiar las características inmunofenotípicas (expresión de *CD10*, *BCL6* y *MUM1*), los subgrupos moleculares (algoritmo de Hans) y el índice de proliferación en una serie de CNS-DLBCL, y valorar su posible repercusión en el pronóstico de la enfermedad (trabajo 3).
- e) Determinar la existencia de alteraciones genéticas en los genes *MYC*, *BCL2* y *BCL6* en una serie de CNS-DLBCL, y valorar su posible repercusión en el pronóstico de la enfermedad (trabajo 3).
- f) Evaluar la expresión de *MYC* y *BCL2* mediante técnicas inmunohistoquímicas en una serie de CNS-DLBCL y valorar su posible repercusión en el pronóstico de la enfermedad (trabajo 3).

4. Resultados



4. Resultados

4.1. Trabajo 1: La detección inmunohistoquímica de la proteína MYC se correlaciona con el estado del gen *MYC* en los linfomas agresivos de células B. *Histopathology* 2011, 59(4), 672–678

Resumen:

La presencia de traslocaciones del gen *MYC* conlleva un mal pronóstico y una respuesta pobre al tratamiento con rituximab-ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisona (R-CHOP) en el linfoma difuso de células grandes B, y probablemente estos enfermos se beneficiarían de un tratamiento quimioterápico más intensivo. La evaluación de las traslocaciones del gen *MYC* requiere estudio citogenético o mediante hibridación in situ fluorescente (FISH), que son métodos caros y no están disponibles en todos los laboratorios. En el presente trabajo evaluamos la expresión de la proteína MYC y de otras características inmunohistoquímicas (CD20, CD3, CD10, BCL6, BCL2 y MUM1), así como el subtipo molecular según el algoritmo de Hans, en una serie de 56 linfomas agresivos de células B en la que el estado del gen *MYC* era conocido. La serie estaba constituida por 9 linfomas de Burkitt (8 casos con traslocación del gen *MYC*), 45 linfomas difusos de células grandes B (9 casos con traslocación del gen *MYC*) y 2 linfomas de células B, inclasificables, de características intermedias entre BL y DLBCL (los dos con traslocaciones del gen *MYC*). La expresión de la proteína MYC en un porcentaje elevado de las células neoplásicas se correlacionó con la traslocación del gen *MYC*. No se observó relación entre la expresión de la proteína MYC y el resto de características inmunofenotípicas, el subtipo molecular o la demostración de ganancia de copias del gen *MYC*. En conclusión, la traslocación del gen *MYC* se asocia a unos niveles de proteína MYC elevados, demostrables mediante técnicas inmunohistoquímicas.

Immunohistochemical detection of MYC protein correlates with *MYC* gene status in aggressive B cell lymphomas

Gustavo Tapia,^{1,*} Raquel López,^{1,*} Ana M Muñoz-Mármol,¹ José L Mate,¹ Carolina Sanz,¹ Ruth Marginet,¹ José'-Tomás Navarro,² Josep-Maria Ribera² & Aurelio Ariza¹

¹Department of Pathology, Hospital Germans Trias i Pujol, Universitat Autònoma de Barcelona, Badalona, Spain, and ²Department of Hematology, Hospital Germans Trias i Pujol, Institut Català d'Oncologia, Badalona, Spain

Date of submission 11 April 2011

Accepted for publication 15 July 2011

Tapia G, López R, Muñoz-Mármol A M, Mate J L, Sanz C, Marginet R, Navarro J-T, Ribera J-M & Ariza A (2011) *Histopathology* 59, 672–678

Immunohistochemical detection of MYC protein correlates with *MYC* gene status in aggressive B cell lymphomas

Aims: *MYC* gene translocation entails a bad prognosis and a poor response to rituximab–cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine and prednisone (R-CHOP) in diffuse large B cell lymphomas (DLBCL), and more intensive chemotherapy regimens could be more effective in those cases. Its evaluation requires cytogenetic or fluorescence *in-situ* hybridization (FISH) studies, which are expensive and not widely available. The aim of this work was to find an immunohistochemical marker able to be used as a screening tool to identify *MYC* translocations.

Methods and results: Aggressive B cell lymphomas in which *MYC* status was assessed during their diagnostic work-up between 2007 and 2010 were collected, their immunophenotype was re-evaluated, and were stratified according to the Hans algorithm.

Two tissue microarrays were built in order to evaluate *MYC* protein expression with a commercially available antibody. The study was performed on 56 specimens: nine Burkitt lymphomas (eight translocated), 45 DLBCLs (nine translocated) and two lymphomas with intermediate features (both translocated). Only *MYC* protein expression detected by immunohistochemistry correlated with *MYC* translocation. No relationship was seen between *MYC* gene copies and protein expression.

Conclusions: *MYC* protein expression detected by immunohistochemistry using a commercially available antibody correlates with *MYC* gene translocation, and could be used as a screening tool to select those cases in which confirmatory genetic testing is mandatory.

Keywords: Burkitt lymphoma, DLBCL, immunohistochemistry, lymphoma, *MYC*

Abbreviations: ABC, activated B cell; BL, Burkitt lymphoma; DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole; DLBCL, diffuse large B cell lymphomas; FISH, fluorescence in-situ hybridization; GC, germinal centre; MUM1, multiple myeloma oncogene 1; R-CHOP, rituximab–cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine and prednisone; TMA, tissue microarray

Introduction

Burkitt lymphoma (BL) is an aggressive neoplasm of B cell lymphocytes arising in the germinal centres. In almost all cases, BL harbours a balanced translocation between *MYC* and immunoglobulin genes [e.g. t(8:14), t(2:8) or t(8:22)] as a unique cytogenetic alteration, that results in deregulated *MYC* protein expression.^{1–3}

In routine surgical pathology practice, BL must be distinguished from diffuse large B cell lymphoma (DLBCL), the most common B cell lymphoma. This distinction is of crucial importance, due to the different prognosis and treatment regimens of both entities.^{4,5} Despite the strict BL diagnostic criteria reported in the literature,¹ distinction from DLBCL is not always possible on morphological and immunophenotypic features alone and cytogenetic or fluorescence *in-situ* hybridization (FISH) studies are mandatory. In cases in which distinction between both entities is not possible, even after recourse to all these techniques, the diagnostic category of 'B-cell lymphoma,

Address for correspondence: G Tapia, Department of Pathology, Hospital Germans Trias i Pujol, Carretera de Canyet s/n, 08916 Badalona, Barcelona, Spain. e-mail: gustavotapiam@hotmail.com *GT and RL contributed equally to this work.

unclassifiable, with features intermediate between BL and DLBCL must be used.^{6,7}

This scenario has been complicated recently by the recognition that the *MYC* gene may be translocated in DLBCL with a frequency of 5–15%. The presence of *MYC* translocation has been proved to be a strong adverse prognostic factor in DLBCL. It results in a more aggressive behaviour and a poorer response to rituximab–cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine and prednisone (R-CHOP)-type chemotherapy, and therefore chemotherapy regimens similar to those used in BL might be more effective.^{8,9} However, DLBCL cases that harbour a *MYC* translocation (*MYC*⁺ DLBCL) are heterogeneous in morphological and immunophenotypic aspects, similar to DLBCL cases without *MYC* translocation (*MYC*–DLBCL). Moreover, the correlation of *MYC* translocation and the molecular classification of lymphomas [germinal centre B cell-like (GC-like) or activated B cell-like (GC-like versus ABC)] or their immunophenotype are contradictory in the different series reported. Therefore, performance of cytogenetic or FISH studies to assess *MYC* gene status in all DLBCL instances seems reasonable, although these techniques are not available in all laboratories.

In this context, the feasibility of an immunohistochemical stain able to predict the status of the *MYC* gene would be very useful. Recently, it has been reported that the presence of the VpreB3 protein alone could be a useful marker in predicting *MYC*⁺ DLBCL, although unfortunately the polyclonal antibody used in this study is not commercially available.¹⁰ We wanted to investigate whether the presence of the *MYC* protein, detected by immunohistochemistry with commercially available antibodies, correlated with the gene status and could be used as a screening tool.

Material and methods

CASE SELECTION AND IMMUNOPHENOTYPE

Aggressive B cell lymphomas diagnosed between 2007 and 2010 in which *MYC* status was investigated as part of their diagnostic work-up were collected from the files of the Pathology Department, Hospital Germans Trias i Pujol, Badalona, Barcelona, Spain. All specimens had been fixed in 4% formalin and embedded in paraffin according to routine procedure.

Every case was reviewed in order to confirm diagnosis according to the World Health Organization (WHO) 2008 classification.¹ Immunohistochemical stains for CD20 (clone L26, 1/300; Dako, Glostrup, Denmark), CD3 (clone PS1, 1/30; Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK), CD10 (clone 56C6, 1/20; Novocastra), BCL6 (clone PG-B6p, 1/30; Dako), BCL2 (clone 124, 1/200; Dako) and multiple myeloma oncogene 1 (MUM1) (clone MUM1p, 1/40; Dako) were re-evaluated and scored

as positive or negative. The proliferating index was evaluated using the Ki67 antibody (clone MIB1, 1/800; Dako). Immunohistochemical stains were performed with the Dako EnVision™ system following the manufacturer's protocol. Cases were classified as GC-like or ABC-like according to the Hans algorithm.¹¹

FISH

In all cases, the status of the *MYC* gene was evaluated during the diagnostic work-up. *MYC* rearrangement was studied by FISH using a dual-colour break-apart commercial probe (LSI *MYC* DC BA; Abbott Molecular, Abbott Park, IL, USA). Four-micrometre-thick paraffin-embedded tissue sections were processed with the Histology FISH Accessory Kit (Dako). Briefly, after pretreatment and enzymatic digestion following the manufacturer's instructions, slides were codenatured for 4 min at 85°C and hybridized overnight at 37°C on a HYBrite (Vysis / Abbott Molecular, Inc., Des Plaines, IL, USA). Following hybridization, coverslips were removed and slides were washed in x 2 SSC / 0.3% Tween-20 at 72°C for 2 min and x 2 SSC / 0.1% Tween-20 for 1 min at room temperature. Following dehydration in graded ethanol series, samples were counterstained with the fluorescence mounting medium containing 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) provided in the kit.

MYC IMMUNOHISTOCHEMISTRY

To evaluate the presence of *MYC* protein, representative 1-mm cores of each case were taken from tissue blocks and two tissue microarrays (TMAs) were built using a tissue microarrayer (Beecher Instruments, Inc., Sun Prairie, WI, USA). Commercially available monoclonal antibody against *MYC* was used (clone Y69, no. 1472-1, 1/100; Epitomics, Inc., Burlingame, CA, USA). Four-µm sections were obtained from the TMA blocks, deparaffinized in xylene and rehydrated in graded alcohols. Heat-induced antigen retrieval was carried out in a microwave oven with citrate buffer at pH 6.0. Endogenous peroxidase was blocked with hydrogen peroxide at 5% and detection was performed using the Dako EnVision™ system following the manufacturer's protocol.

The pattern and percentage of positive neoplastic cells were evaluated by two pathologists independently. Discrepant scores between pathologists were reviewed on a multiheaded microscope and an agreement was reached.

STATISTICAL ANALYSIS

The different variables studied were compared using the chi-squared test or Student's t-test, and analyses were conducted using the spss statistical package,

versión 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Differences were considered significant when P-values were < 0.05.

Results

CASES AND CLINICAL DATA

A total of 56 cases were collected from files from the Department of Pathology. The reviewed diagnoses comprised BL in nine cases, DLBCL in 45 cases and B cell lymphomas, unclassifiable, with features intermediate between BL and DLBCL (BL/DLBCL) in two cases. Clinical characteristics regarding age and sex distribution are summarized in Table 1.

IMMUNOPHENOTYPE AND CORRELATION WITH MYC STATUS

With regard to BL, eight of nine cases (88.9%) showed a translocated *MYC* gene, whereas the remaining case showed an increased number of *MYC* gene copies (four copies / cell). All BL cases were CD10 and BCL6-positive (100%), two of nine were BCL2-positive (22.2%) and one of five was positive for MUM1 (20%). The mean proliferating index, detected by the monoclonal anti-

body Ki67, was 93.9% (range 80–100%). All cases corresponded to the GC-like subtype according to the Hans algorithm. Immunohistochemical findings are summarized in Table 1.

In BL/DLBCL cases, a *MYC* gene translocation was detected in both instances. Both were CD10 and BCL6-positive, whereas BCL2 was positive in one of the two cases and MUM1 was positive in the only case in which it was studied. Proliferation index was 100% in both cases (Table 1).

Among DLBCLs, a translocated *MYC* gene was detected in nine of 45 cases (20%) and nine additional cases (20%) showed an increased number of gene copies (three to five copies / cell).

In *MYC*⁻ DLBCL lymphomas, CD10 was positive in 19 of 36 cases (52.8%), BCL6 in 31 of 35 (88.6%), BCL2 in 28 of 36 (77.8%) and MUM1 in 26 of 33 (78.8%). The mean proliferation index (Ki67) was 76% (range 35–95%). Hans algorithm classified 16 of 36 cases as GC-like and 20 of 36 cases as ABC-like (Table 1). In *MYC*⁺ DLBCL cases, CD10 was positive in five of nine (55.6%) and BCL6 in five of seven (71.4%) cases, whereas BCL2 and MUM1 were positive in all cases evaluated (Table 1). The mean

Table 1. Demographic data and immunophenotype of BL, BL/DLBCL and DLBCL cases

	BL (n = 9)	BL/DLBCL (n = 2)	DLBCL (n = 45)		P*
			MYC ⁺ (n = 9)	MYC ⁻ (n = 36)	
Age, median (range), years	39.9 (3–81)	58 (44–72)	60 (39–80)	67 (39–84)	0.261
Gender (%)					
Male	66.7	50	77.8	52.8	0.174
Female	33.3	50	22.2	47.2	
Immunophenotype, n (%)					
CD10 ⁺	9/9 (100)	2/2 (100)	5/9 (55.6)	14/36 (38.9)	0.365
BCL6 ⁺	9/9 (100)	2 (100)	5/7 (71.4)	31/35 (88.6)	0.237
BCL2 ⁺	2/9 (22.2)	1/2 (50)	9/9 (100)	28/36 (77.8)	0.119
MUM1 ⁺	1/5 (20)	1/1 (100)	8/8 (100)	26/33 (78.8)	0.153
Ki67 index, mean (range)	93.9 (80–100)	100	65 (25–95)	76 (35–95)	0.299
Hans algorithm					
GC-like	9/9 (100)	2/2 (100)	5/9 (55.6)	16/36 (44.4)	0.550
ABC-like	0/9 (0)	0/2 (0)	4/9 (44.4)	20/36 (55.6)	

*The distribution of variables between *MYC*⁺ and *MYC*⁻DLBCL cases were investigated using chi-squared analysis or Student's *t*-test (for quantitative variables).

BL, Burkitt lymphoma; BL/DLBCL, B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between BL and DLBCL; DLBCL, diffuse large B cell lymphoma; ABC, activated B cell; GC, germinal centre; MUM1, multiple myeloma oncogene 1.

proliferation index (Ki67) was 65% (range 25–95%). Five of nine cases were classified as GC-like, whereas four of five were ABC-like. Statistical analysis showed no significant relation between any immunohistochemical stain or Hans classification and *MYC* gene translocation or increased gene copy number.

C-MYC IMMUNOHISTOCHEMISTRY AND CORRELATION WITH C-MYC STATUS

Overall, independently of the diagnosis, *MYC*⁺ lymphomas showed *MYC* nuclear positivity in 70% of neoplastic cells, whereas *MYC*⁻ lymphoma cells were positive for *MYC* in only 28% (Figure 1). The relationship between *MYC* gene translocation and *MYC* protein expression detected by immunohistochemistry was statistically significant ($P < 0.001$, Table 2). No cytoplasmic immunostaining was observed in any case.

In all BL cases harbouring a *MYC* translocation, diffuse and intense nuclear staining for *MYC* monoclonal antibody was observed in neoplastic cells, with a mean of 81% positive cells (range 50–100%). In the only BL case with no *MYC* translocation, nuclear *MYC* staining was observed in 30% of neoplastic cells (Table 2 and Figure 1J–L).

In the only BL/DLBCL lymphoma case in which there was available tissue for *MYC* immunohistochemistry, 60% of cells were positive with the same pattern shown by BL cases. As mentioned previously, this case showed a *MYC* gene translocation.

Regarding DLBCL, *MYC*⁺ cases showed intense nuclear staining with the *MYC* monoclonal antibody in 61% of neoplastic cells (range 5–95%), whereas in *MYC*⁻ cases nuclear positivity for *MYC* was seen in 28% of neoplastic cells (range 5–80%) (Figure 1A–I). Statistical analysis showed a significant correlation between *MYC* staining and *MYC* gene status (Table 2). No significant differences in *MYC* protein expression were seen between increased copies versus normal *MYC*⁻ DLBCL cases (31% versus 26%, data not shown).

Discussion

DLBCL is a heterogeneous entity in its clinical characteristics. From a pathological point of view, its heterogeneity is also reflected in the DLBCL morphological, immunophenotypic and genetic features. Several studies have tried to predict DLBCL biological behaviour based on its morphology (immunoblastic versus centroblastic), immunophenotype (CD5⁺ DLBCL, BCL2, BCL6, p53),¹² cell of origin (GC-like versus activated B cell-like)^{13,14} or genetic alterations, but the results obtained have been contradictory.

Recently, it has been shown that the presence of a *MYC* gene translocation in DLBCL, which occurs in up to 15% of the cases, has a high prognostic impact and results in a more aggressive course and poor response to R-CHOP-type chemotherapy used for DLBCL.^{8,9} Moreover, it has been postulated that *MYC*⁺ DLBCL cases should be treated preferably with chemotherapy regimens similar to those used for BL. Therefore, additional studies to investigate the *MYC* gene status should be mandatory in all DLBCL cases. The studies can be performed by karyotyping of metaphase neoplastic cells or by FISH analysis, but the former requires viable fresh tissue (which in most instances is not available) and the second may be challenging in some cases, and both techniques are not performed routinely in many pathology laboratories.

In this context, the feasibility of a universally available screening tool that could select those DLBCL cases harboring a *MYC* gene translocation would be very useful. Unfortunately, *MYC*⁺ and *MYC*⁻ DLBCL share the same morphological features and no unique immunophenotypic marker has been found to be specific in predicting *MYC* gene status. Regarding the cell of origin, Barrans et al.⁹ found a significantly higher frequency of GC-like phenotype in *MYC*⁺ DLBCL, although Savage et al.⁸ did not find such association. Recently, Rodig et al.¹⁰ have reported that VpreB3 expression as detected by immunohistochemistry could be useful as a screening tool for predicting *MYC* gene translocation, although the antibody they used is not commercially available.

Taking into consideration that *MYC* gene translocation and amplification have been found to correlate with increased mRNA levels in non-Hodgkin lymphoma,¹⁵ we hypothesized that it would also result in increased *MYC* protein expression detectable by immunohistochemistry. In this study we could demonstrate a significantly higher *MYC* protein expression in translocated DLBCL compared to non-translocated DLBCL (61% versus 28%). These differences were independent of other lymphoma cell features, such as immunophenotype, proliferation index or cell of origin. In non-translocated cases, we did not find any difference with regard to normal versus increased gene copies (28% versus 31%). Moreover, *MYC* protein expression seems to be independent of lymphoma type, as we found no statistical differences in the percentage of *MYC* positive cells between Burkitt lymphoma and *MYC*⁺ DLBCL (81% versus 61%).

In contrast with a previous study on this subject¹⁶ we identified nuclear staining in every case, but no cytoplasmic staining was observed. The antibody clone used in both studies was the same, but antigen retrieval conditions were different. Thus, whereas

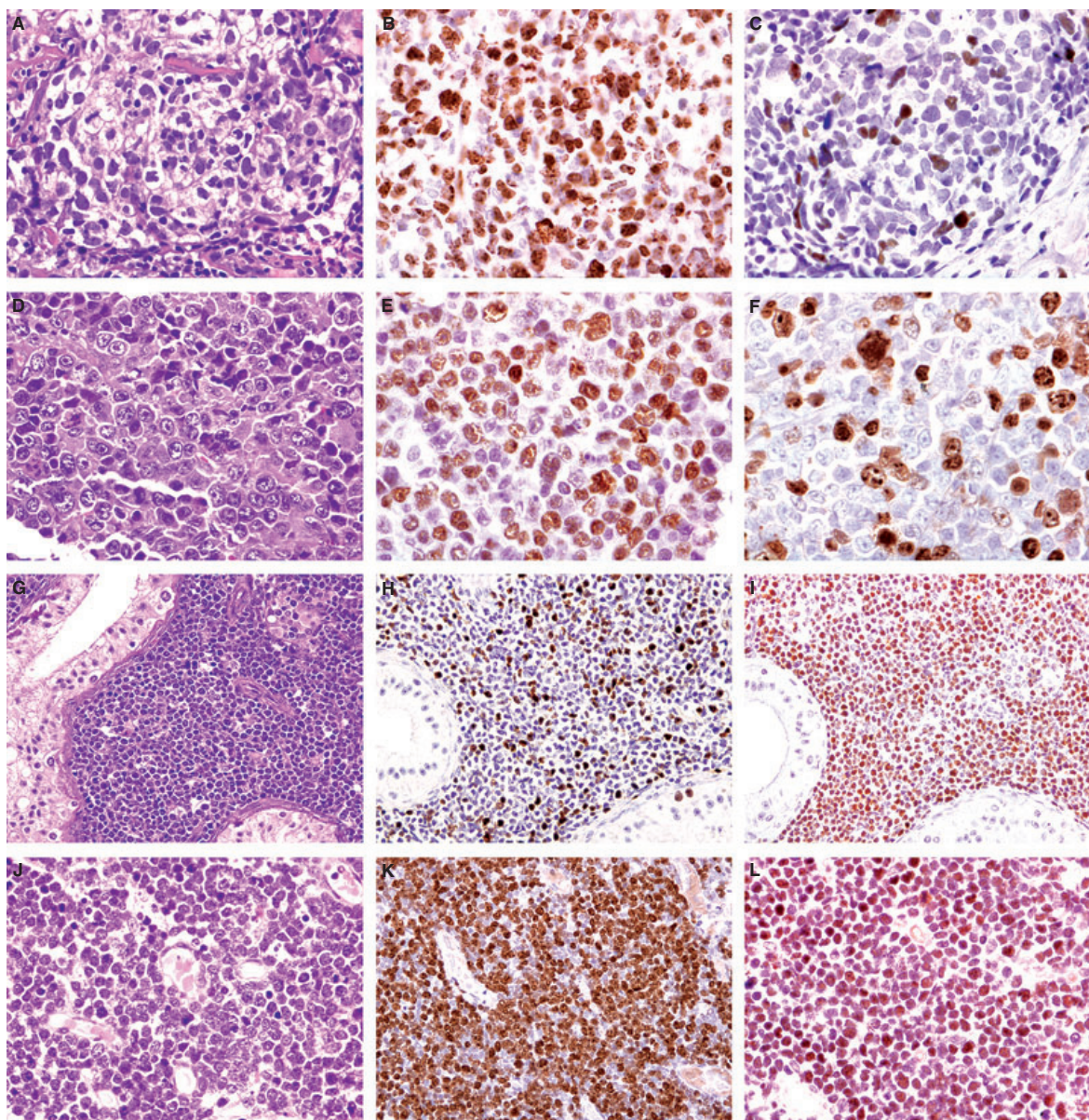


Figure 1. Individual examples of aggressive lymphomas. Patient 1 (A–C): diffuse large B cell lymphoma MYC⁻. A, Haematoxylin and eosin (H&E); B, Ki67 with high proliferating index; C, MYC stain showing low percentage of positive cells. Patient 2 (D–F): diffuse large B cell lymphoma MYC⁺. D, H&E; E, Ki67 with high proliferating index; F, MYC stain showing intermediate percentage of positive cells. Patient 3 (G–I): diffuse large B cell lymphoma MYC⁺. G, H&E; H, Ki67 with low–intermediate proliferating index; I, MYC stain with high percentage of positive cells. Patient 4 (J–L): Burkitt lymphoma MYC⁺. J, H&E; K, Ki67 with nearly 100% of proliferating index; L, MYC stain with high percentage of positive cells.

Ruzinoba et al. used ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) at pH 8.0 in a steam pressure cooker, we used citrate buffer at pH 6.0 in a microwave oven. This discrepancy could have influenced the sensitivity and specificity of the antibody. Although MYC functions are not completely delineated,

it is known to play a critical biological role as a nuclear transcription factor, which is congruent with its nuclear immunoreaction. Moreover, other studies using the same antibody did not mention cytoplasmic staining.

Table 2. Summary of the MYC immunohistochemical (IHC) results in the different diagnostic groups and MYC-gene status

	BL		DLBCL		Total	
	MYC ⁺ (n = 8)	MYC ⁻ (n = 1)	MYC ⁺ (n = 9)	MYC ⁻ (n = 36)	MYC ⁺ (N = 17)	MYC ⁻ (N = 37)
MYC IHC (% positive cells)	81	30	61	28	70	28
P*	NA		<0.05		<0.001	

*Statistical relationship between the two variables was evaluated using Student's *t*-test analysis for independent variables. NA, not applicable; BL, Burkitt lymphoma; BL/DLBCL, B cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between BL and DLBCL; DLBCL, diffuse large B cell lymphoma.

Interestingly, some cases of MYC⁻ DLBCL showed a high percentage of MYC nuclear staining (up to 80%) despite the absence of translocation or increased gene copy numbers. This could be due to alternative gene activation or post-transcriptional up-regulation. Whether this altered protein expression is correlated with prognosis or bad response to R-CHOP-based chemotherapy remains to be established.

In conclusion, we have demonstrated that immunohistochemical detection of MYC protein using a commercially available antibody correlates with the presence of MYC gene translocation, independently of the immunophenotype and cell of origin of lymphoma cells. However, additional studies on larger series need to be performed in order to confirm the role of MYC immunohistochemistry as a screening tool to identify DLBCL cases with MYC translocations that need additional genetic studies.

Acknowledgements

This study was supported in part by Marató TV3 grant 02/1210.

References

1. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL et al. Tumours of haematopoietic and lymphoid tissues, 4th edn. Lyon: IARC, 2008.
2. Dave SS, Fu K, Wright GW et al. Molecular diagnosis of Burkitt's lymphoma. *N. Engl. J. Med.* 2006; 354; 2431-2442.
3. Hummel M, Bentink S, Berger H et al. A biologic definition of Burkitt's lymphoma from transcriptional and genomic profiling. *N. Engl. J. Med.* 2006; 354; 2419-2430.
4. Blum KA, Lozanski G, Byrd JC. Adult Burkitt leukemia and lymphoma. *Blood* 2004; 104; 3009-3020.

5. Coiffier B. State-of-the-art therapeutics: diffuse large B-cell lymphoma. *J. Clin. Oncol.* 2005; 23; 6387-6393.
6. Rosenwald A, Ott G. Burkitt lymphoma versus diffuse large B-cell lymphoma. *Ann. Oncol.* 2008; 19; 67-69.
7. Bellan C, Stefano L, Giulia dF, Rogena EA, Lorenzo L. Burkitt lymphoma versus diffuse large B-cell lymphoma: a practical approach. *Hematol. Oncol.* 2010; 28; 53-56.
8. Savage KJ, Johnson NA, Ben-Neriah S et al. MYC gene rearrangements are associated with a poor prognosis in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with R-CHOP chemotherapy. *Blood* 2009; 114; 3533-3537.
9. Barrans S, Crouch S, Smith A et al. Rearrangement of MYC is associated with poor prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated in the era of rituximab. *J. Clin. Oncol.* 2010; 28; 3360-3365.
10. Rodig SJ, Kutok JL, Paterson JC et al. The pre-B-cell receptor associated protein VpreB3 is a useful diagnostic marker for identifying c-MYC translocated lymphomas. *Haematologica* 2010; 95; 2056-2062.
11. Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC et al. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood* 2004; 103; 275-282.
12. Lossos IS, Morgensztern D. Prognostic biomarkers in diffuse large B-cell lymphoma. *J. Clin. Oncol.* 2006; 24; 995-1007.
13. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 2000; 403; 503-511.

14. Shipp MA, Ross KN, Tamayo P et al. Diffuse large B-cell lymphoma outcome prediction by gene-expression profiling and supervised machine learning. *Nat. Med.* 2002; 8; 68–74.
15. Stasik CJ, Nitta H, Zhang W et al. Increased MYC gene copy number correlates with increased mRNA levels in diffuse large B-cell lymphoma. *Haematologica* 2010; 95; 597–603.
16. Ruzinova MB, Caron T, Rodig SJ. Altered subcellular localization of c-Myc protein identifies aggressive B-cell lymphomas harboring a c-MYC translocation. *Am. J. Surg. Pathol.* 2010; 34; 882– 891.
17. Wolfer A, Wittner BS, Irimia D et al. MYC regulation of a 'poorprognosis' metastatic cancer cell state. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2010; 107; 3698–3703.
18. Iwata T, Schultz D, Hicks J et al. MYC overexpression induces prostatic intraepithelial neoplasia and loss of Nkx3.1 in mouse luminal epithelial cells. *PLoS ONE* 2010; 5; e9427.



4.2. Trabajo 2: Determinación del estado del gen *MYC* en linfomas agresivos de células B: impacto de la selección de la sonda FISH.
Histopathology 2013, 63(3), 418–424.

Resumen:

La detección de alteraciones del gen *MYC* es de vital importancia en el diagnóstico del linfoma de Burkitt, pero también en la evaluación pronóstica y en la elección terapéutica de otros linfomas agresivos de células B. En este trabajo comparamos los resultados obtenidos al estudiar el estado del gen *MYC* mediante diferentes sondas comerciales de FISH en una serie de 91 linfomas agresivos. Se utilizaron tres sondas diferentes: una sonda de fusión *IGH-MYC* y dos sondas de separación. En los 13 casos con reordenamiento *IGH-MYC*, la traslocación pudo detectarse con las tres sondas evaluadas. Por el contrario, en 7 de los 13 casos (54%) con reordenamiento no-*IGH-MYC* (*IGK-MYC*, *IGL-MYC* o no-*IG-MYC*), la traslocación pudo detectarse inequívocamente con una única sonda (de separación), siendo el resultado de las otras sondas no concluyente o negativo (falso negativo). Por otro lado, 9 de los 15 casos (60%) con un patrón sugestivo de traslocación no-*IGH-MYC* con la sonda de fusión *IGH-MYC* eran debidos a ganancia de copias del gen *MYC*, y no a la presencia de reordenamiento, tal y como se demostró con las dos sondas de separación (falso positivo). En conclusión, dada la importancia de la evaluación de la traslocación del gen *MYC* en linfomas agresivos y los resultados obtenidos en este estudio, proponemos una aproximación doble con el uso de una sonda FISH de fusión y otra de separación a la hora de valorar la presencia de alteraciones en la banda cromosómica 8q24.

MYC status determination in aggressive B-cell lymphoma: the impact of FISH probe selection

Ana M Muñoz-Mármol,¹ Carolina Sanz^{1,2} Gustavo Tapia,^{1,3} Ruth Marginet,¹ Aurelio Ariza^{1,3} & José L Mate^{1,3}

¹Department of Pathology, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona, Barcelona, Spain, ²Institut d'Investigació Sanitària Germans Trias i Pujol (IGTP), Badalona, Barcelona, Spain, and ³Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

Date of submission 26 March 2013

Accepted for publication 30 April 2013

Published online Article Accepted 3 May 2013

Muñoz-Mármol A M, Sanz C, Tapia G, Marginet R, Ariza A & Mate J L (2013) *Histopathology* 63, 418–424

MYC status determination in aggressive B-cell lymphoma: the impact of FISH probe selection

Aims: To assess how hybridization probe design may affect *MYC* status determination in Burkitt lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma.

Methods and results: We compared the results obtained with one dual-fusion and two break-apart commercial probes in a retrospective series of 91 aggressive B-cell lymphomas. All three probes were able to detect the *IGH-MYC* translocation in every case bearing it (13/13). However, seven of 13 (54%) non-*IGH-MYC* (light-chain immunoglobulin or non-immunoglobulin-*MYC*) rearrangements were unambiguously detected by just one of the probes tested. On the other hand, when the *IGH-MYC* dual-fusion probe was used, nine of 15

(60%) cases with a hybridization pattern suggestive of a non-*IGH-MYC* translocation were attributable to *MYC* copy gain rather than *MYC* rearrangement, as demonstrated by both break-apart probes.

Conclusions: Taking into account the prognostic and therapeutic implications of the *MYC* translocation, probe design and limitations should be particularly kept in mind when *MYC* hybridization patterns are interpreted. In our experience, detection of 8q24 abnormalities could be optimized by a two-probe approach involving the application of both *IGH-MYC* dual-fusion and *MYC* break-apart selected kits.

Keywords: break-apart, Burkitt lymphoma, diffuse large B-cell lymphomas, dual-fusion, fluorescence in-situ hybridization, *MYC*, translocation

Introduction

MYC gene rearrangement, the characteristic cytogenetic alteration of Burkitt's lymphoma (BL), is also present in 10–15% of diffuse large B-cell lymphomas (DLBCLs) and in 35–50% of B-cell lymphomas with features intermediate between those of BL and DLBCL (BL/DLBCL).^{1–3} In DLBCL, *MYC* translocation is associated with a worse prognosis and a poor response to R-

CHOP chemotherapy^{4,5} especially in cases with BCL-2 overexpression.^{6,7} More intensive chemotherapy regimens have been proposed for those patients.⁸ Thus, *MYC* gene assessment is crucial in making a diagnosis of BL, and is mandatory in establishing the prognosis and treatment for DLBCL.

The t(8;14)(q24;q32) translocation between the immunoglobulin heavy-chain (*IGH*) locus and the *MYC* gene is found in 70–80% of BLs, whereas variant t(8;22) and t(2;8) translocations with lambda and kappa light chains (*IGL* and *IGK*) occur in nearly all of the remaining cases.^{9,10} In DLBCL, light-chain immunoglobulin (IG) and non-*IG* *MYC* translocation partners are more frequent, accounting for up to 50% in BL/DLBCL.^{2, 11,12} Breakpoints are widely dispersed on the 8q24 locus, and depend on the *MYC* translocation partner (Figure 1A). In t(8;14), breakpoints are located 5' (centromeric)

Address for correspondence: A M Muñoz-Mármol, Servei d'Anatomia Patològica, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Carretera de Canyet, S/N, 08916-Badalona, Barcelona,

Spain. e-mail: ammunoz.germanstrias@gencat.cat

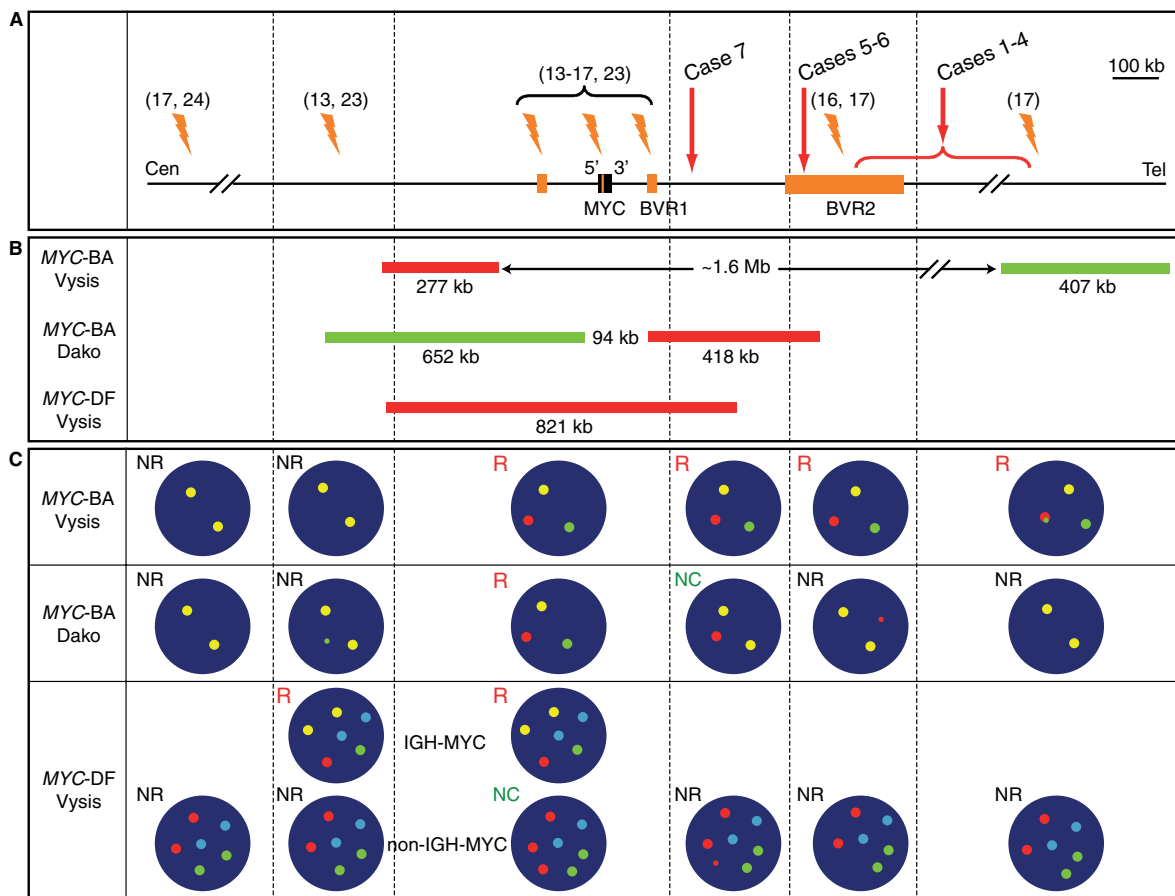


Figure 1. A. Distribution of 8q24 breakpoints. Vertical red arrows indicate breakpoints from discrepant cases (Cases 1–7). Orange rays point to reported MYC breakpoints (references are shown in brackets). The regions most frequently involved in MYC rearrangement are represented by orange boxes. Most common IGH–MYC breakpoints occur either at some distance upstream of the gene or in 5' non-coding gene sequences.^{13–15} Far 5' IGH rearrangements have also been described.^{13,23,24} Light-chain IG breakpoints map downstream of the gene, within Burkitt variant rearrangement regions 1 (BVR1) and 2 (BVR2).^{16,23} Non-IG rearrangements are dispersed over several Mb on each side of MYC.¹⁷ Cen, centromere; Tel, telomere. B. Schematic representation of the region covered by the three MYC probe sets. The DF green probe, which covers the IGH locus, has been omitted for simplification. Approximate probe sizes and gaps between red and green probes (in BA sets) are provided. C. Ideograms showing expected signal patterns. The Vysis DF and Dako BA probes would yield an apparently normal hybridization pattern in most telomeric breakpoints, whereas the Vysis BA probe would miss far 5' rearrangements. R, rearranged pattern; NR, non-rearranged pattern; NC, non-conclusive pattern. Red/green fusion signals are represented by a yellow spot. The chromosome 8 centromeric enumeration probe (CEP8) of the Vysis DF set is shown as a light blue spot.

to the MYC coding region,^{13–15} whereas variant IG–MYC rearrangements are consistently found 3' (telomeric) to the gene.¹⁶ Non-IG translocation breakpoints are mostly telomeric in relation to MYC, although they have also been described upstream of the gene.¹⁷ The majority of 8q24 breakpoints are relatively close to the gene, but 11% of IG–MYC rearrangements lie far 5' or 3' to it, and non-IG breakpoints have been described several Mb away on each side of MYC.^{13–17} Translocation events lead to deregulated MYC expression^{18–20} as a consequence of proximity to the transcriptional enhancers of partner genes, even when the 8q24 break-

point is far away from the gene.^{17,21w} Usually, fluorescence in-situ hybridization (FISH) is the chosen method for MYC rearrangement detection. Two types of commercial FISH probe designs are available for the detection of MYC translocation (Figure 1B). In dual-fusion (DF) kits, the two labelled probes cover breakpoint regions in each of the two loci involved in the rearrangement. In contrast, in break-apart (BA) designs, the two labelled probes flank each side of the expected MYC breakpoint region. This second approach permits the determination of MYC rearrangement independently of its translocation

partner, but does not allow partner identification when applied on interphase nuclei.

Although FISH methods are well established in most pathology laboratories,^{22,23} no probe is able to cover all *MYC* breakpoints described. Therefore, far 5' and 3' breakpoints, complex rearrangements and cryptic insertions leading to *MYC* deregulation may be overlooked.^{14,16,24,25} Given the diagnostic and prognostic significance of *MYC* gene translocation in aggressive B-cell lymphomas (BCLs), we decided to evaluate the relative frequency of discordant cases and its potential impact on *MYC* status determination when different probe designs are used. With this aim, we compared the results obtained with two different break-apart (*MYC-BA*) commercial probes and one dual-fusion (*MYC-DF*) commercial probe in a retrospective series of aggressive BCLs.

Materials and methods

CASE SELECTION

Ninety-one cases of aggressive BCL (nine BLs, 81 DLBCLs, and one BL/DLBCL) that had been characterized in previous studies^{18,26} were collected from the files of the Pathology Department, Hospital Germans Trias i Pujol, Badalona, Barcelona, Spain. Representative 1-mm cores from each case were taken from formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissue blocks, and arranged in five tissue microarrays (TMAs) with a microarrayer (Beecher Instruments, Sun Prairie, WI, USA).

FLUORESCENCE IN-SITU HYBRIDIZATION

MYC rearrangement was evaluated by FISH on sequential TMA sections using two commercial BA probes and one commercial DF probe: *MYC* FISH DNA probe, Split Signal (Dako, Glostrup, Denmark); Vysis LSI *MYC* dual colour, BA rearrangement probe (Abbott Molecular, Des Plaines, IL, USA); and Vysis LSI t(8;14) *IGH/MYC/CEP8* Tri-colour DF probe (Abbott Molecular).

Briefly, 4- μ m-thick paraffin-embedded tissue sections were deparaffinized and processed with the Histology FISH Accessory Kit (Dako). After pretreatment and enzymatic digestion according to the manufacturer's instructions, slides were codenatured for 4 min at 85°C and hybridized overnight at 37°C (Vysis probes) or 45°C (Dako probe) on a HYBrite (Abbott Molecular). Following hybridization, coverslips were removed, and slides were washed at 72°C for 2 min in 2.9 SSC/0.3% Tween-20 (Vysis probes) or at 65°C for 10 min in the stringent wash buffer provided with the kit (Dako probe). After dehydration in a graded ethanol series, samples were counterstained with the kit fluorescence mounting médium containing 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI).

Hybridization signals were scored in 100 non-overlapping nuclei. For BA probes, *MYC* was interpreted as non-translocated when co-localization of red and green signals was seen, and as rearranged when red and green signals split off. For the DF probe, a cut-off point was established by hybridization on five cases of follicular hyperplasia. *IGH-MYC* translocation was defined as >19% of tumour nuclei containing red/ green fusion signals (mean plus three standard deviations in non-neoplastic controls). Cases without fusion signals but with an increased *MYC*/chromosome enumeration probe 8 (CEP8) ratio were considered to be not conclusive, as they were compatible with both a non-*IGH-MYC* rearrangement and extra copies of non-rearranged *MYC* genes.

Results

Of the 91 cases included in the study, 85 (nine BLs, 75 DLBCLs, and one BL/DLBCL) could be evaluated with all probes. The results are summarized in Tables 1 and 2 and Figure 2. In 26 cases, the hybridization patterns obtained with at least one of the probes used were compatible with an 8q24 rearrangement.

As demonstrated with the *IGH-MYC* DF probe, 13 samples (13/26) showed an *IGH-MYC* translocation. In all 13 samples, the translocation was detected by each of the three probes applied in the study, which yielded completely concordant results. Thirteen cases (13/26) showed a global hybridization pattern suggestive of non-*IGH-MYC* translocation (either a variant *IGK/IGL-MYC* or a non-*IG-MYC* rearrangement). Seven of those 13 samples (54%) provided conflictive results when different probes were applied (Table 2; Figure 2).

Table 1. Summary of *MYC* FISH results in the various diagnostic groups

Diagnosis	<i>MYC</i> -NR*	<i>IGH-MYC</i> †	Non- <i>IGH-MYC</i> ‡	<i>MYC</i> -NC§
BL	1	4	4	0
DLBCL/BL	0	1	0	0
DLBCL	57	8	9	1
Total	58	13	13	1

**MYC*-NR: *MYC* not rearranged.

†*IGH-MYC*: *MYC* translocation with *IGH* locus.

‡Non-*IGH-MYC*: *MYC* rearranged either with *IG* light chains or with a non-*IG* partner.

§*MYC*-NC: *MYC* non-conclusive.

Table 2. MYC FISH patterns obtained in potentially conflictive cases

Case ID	Age	Diagnosis	MYC-BA Vysis*	MYC-BA Dako*	MYC-DF Vysis†	MYC status
1	33	BL	1F1R1G (+)	2F (-)	2A2R2G (-)	Rearranged
2	66	DLBCL	1F1R1G (+)	2F (-)	2A2R2G (-)	Rearranged
3	33	DLBCL	1F1R1G (+)	2F (-)	2A2R4G (-)	Rearranged
4	84	DLBCL	1F1R1G (+)	2F (-)	1A2R3G (NC)	Rearranged
5	48	BL	1F1R1G (+)	2F1miniR (NC)	2A2R2G (-)	Rearranged
6	23	DLBCL	1F1R1G (+)	2F1miniR (NC)	2A2R2G (-)	Rearranged
7	77	DLBCL	2F1R1G (+)	3F1R (NC)	3A3R1miniR3G (NC)	Rearranged‡
8	47	BL	4F (-)	4F (-)	2A4R2G (NC)	Not rearranged‡
9	73	DLBCL	3-5F (-)	3-5F (-)	3A4R3G (NC)	Not rearranged‡
10	32	DLBCL	3F (-)	3F (-)	2A3R3G (NC)	Not rearranged‡
11	42	DLBCL	3F (-)	3F (-)	2A3R2G (NC)	Not rearranged‡
12	77	DLBCL	3F (-)	3F (-)	1-2A3R2-3G (NC)	Not rearranged‡
13	40	DLBCL	3F (-)	3F (-)	1A3R2-3G (NC)	Not rearranged‡
14	50	DLBCL	3F (-)	3F (-)	2A3R1G (NC)	Not rearranged‡
15	24	DLBCL	3F (-)	3F (-)	2A3R2G (NC)	Not rearranged‡
16	72	DLBCL	3F (-)	3F (-)	2A3R2G (NC)	Not rearranged‡
17	75	DLBCL	1F1R (NC)	2F (-)	2A2R2G (-)	Non-conclusive

+, Positive FISH pattern; -, negative FISH pattern; NC, non-conclusive hybridization pattern.

*F: not rearranged MYC fusion signal; R and G: red and green signals corresponding to MYC rearrangement events.

†A: aqua-labelled CEP8 signal; R: red-labelled MYC locus signal; G: green-labelled IGH locus signal; miniR: small faint red signal.

‡MYC copy gain.

Cases 1–4 showed a positive break-apart hybridization pattern with the Vysis BA probe, whereas both the Dako BA and Vysis DF probe sets yielded negative results. This hybridization pattern was interpreted as a far 3' translocation event, telomeric to the region covered by both the Vysis DF and Dako probes (Figures 1 and 2).

Cases 5 and 6 showed a positive translocation pattern with the Vysis BA probe and a normal DF pattern. A faint, small red signal (miniR) was detected in some cells with the Dako BA probe, proving the presence of a MYC 3' breakpoint near the telomeric end of the region covered by this probe set (Figures 1 and 2).

Case 7 showed two non-translocated MYC copies and a rearranged MYC copy. The latter was shown by a clear red/green split with the Vysis BA probe and by a single red signal with the Dako BA set.

Although the DF pattern was initially considered to be not rearranged, closer examination of the sample after the evaluation of BA results allowed the detection of a miniR signal in some tumour cells. These results are consistent with the presence of a MYC 3' breakpoint in the region covered by the red Dako probe and near the end of the DF red probe (Figures 1 and 2).

Additionally, we observed several potentially conflictive non-rearranged samples (Cases 8–16). In those cases, although the increased MYC/CEP8 ratio observed with the DF probe could be interpreted as a non-IGH-MYC translocation, BA assays demonstrated that red extra signals were attributable to MYC copy gain but not to MYC translocation (Table 2; Figure 2). Therefore, a MYC rearrangement was actually present in only nine of the 15 cases (60%) showing a DF hybridization pattern suggestive of non-IGH-MYC translocation.

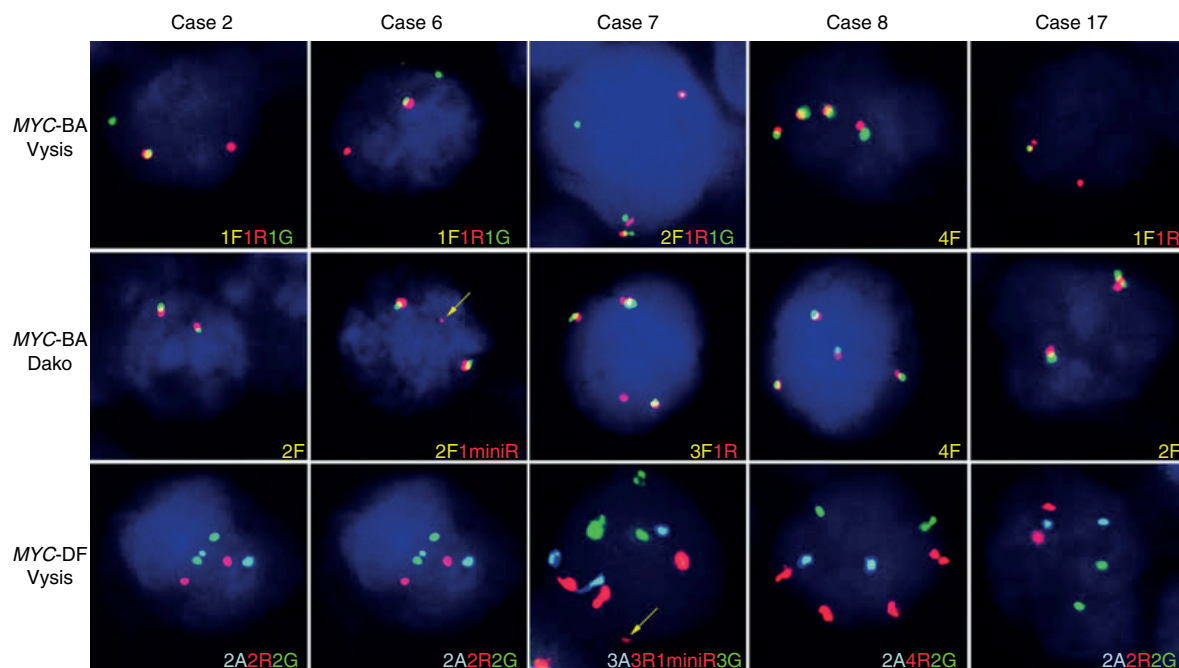


Figure 2. FISH images from some representative conflictive cases hybridized with the different probes. A summary of the signal pattern is included for each patient. A red isolated signal is obtained when the breakpoint falls in the area covered by the red probe (Case 7, MYC-BA Dako probe). When the breakpoint maps near the very end of the probe, this isolated signal is visualized as a small red faint spot (miniR, yellow arrow; cases 6 and 7).

Finally, case 17 provided a normal hybridization pattern when studied with the DF and Dako BA probes, whereas the Vysis BA set showed loss of the telomeric portion (Table 2; Figure 2). This pattern, interpreted as non-conclusive, was compatible with either a far 3' gene rearrangement (and concomitant derivative chromosome loss) or a partial deletion of the locus covered by the green probe.

Discussion

The study of MYC translocations in pathology laboratories is well-established, as it is necessary for the diagnosis of BL. Currently, such study is also mandatory in the management of DLBCL, in which MYC translocations have been demonstrated to correlate with an adverse clinical outcome and a poor response to chemotherapy. Therefore, the accurate assessment of MYC status is crucial for risk stratification of these patients.

Among the different methods available for studying gene translocations, interphase FISH analysis on FFPE tissue sections is probably the most common.^{22,27,28} It is a fast, easy and robust technique with which to determine chromosomal breaks, and can be

performed even on old archival specimens. Moreover, it has the advantage over conventional cytogenetics of not requiring viable fresh tissue, which is not always available.

There are two different FISH strategies for the detection of MYC gene translocation (DF and BA), and several probes of each modality are commercially available. In our study, we compared the results obtained with three MYC probes on a series of aggressive BCLs. As shown in Figure 1B, all probes cover the breakpoint region that is most frequently involved in IGH-MYC translocations, which is situated between 190 kb 5' to 50 kb 3' of the gene. However, only one of the tested probes (Vysis BA) would detect most telomeric rearrangements. On the other hand, far 5' IGH-MYC and some previously described cryptic rearrangements would be detected only by IGH-MYC DF probes.^{24,25}

In our series, all cases with an IGH-MYC translocation were identified by each of the three probes. As this is the most frequent MYC chromosomal aberration described in BL (up to 85%), any of the probes used would be effective enough in detecting most MYC rearrangements in BL. Light-chain IGH and non-IGH-MYC translocations, which are quite common in DLBCL,

frequently map far telomeric of the gene. Therefore, it is expected that probes that are not designed to cover at least a breakpoint region 1.0 Mb 3' of *MYC* will be less sensitive when applied to this kind of lymphoma. Underestimation of far telomeric *MYC* translocation events would then result in an inaccurate risk stratification of those patients.

Indeed, when *MYC* was rearranged with a non-*IGH* partner, a significant proportion of cases showed conflictive results. Seven of these 13 cases (54%) were only clearly seen as translocated when the Vysis BA probe was used. In three of them, 8q24 chromosome breaks mapped in the 3' end of the region covered by the Dako BA probe (Cases 5 and 6) or the Vysis DF probe (Case 7). Although the exact positions targeted by commercial probes are not provided, these breakpoints would probably be located near to or at the 5' end of the Burkitt variant rearrangement region 2 (BVR2). In this situation, red signals from Dako BA and/or DF probes split, resulting in an extra red spot that is visualized as a miniR signal in some cells but can be easily missed in high-background specimens, owing to its small size.

Rearrangements in Cases 1–4 were detected only by the Vysis BA probe. These cases most probably had 8q24 translocation events situated downstream of the region covered by the other two probes, either inside or downstream of BVR2 (Figure 1). Although less plausible, we cannot rule out other options, such as inversions, insertions, or complex rearrangements, which would not necessarily deregulate *MYC* expression. As far as we know, such a 'false-positive' translocation result has never been described in relation to *MYC*, although it has been sporadically reported in association with other FISH BA probes.²⁹

On the other hand, specimens bearing extra copies of a non-rearranged *MYC* gene (as demonstrated with BA probes) may show a DF hybridization pattern suggestive of a non-*IGH-MYC* translocation (i.e. an increased *MYC/CEP8* ratio). DLBCL karyotypes are usually quite complex,^{1,30} and increased *MYC/CEP8* ratios can be explained by events other than *MYC* rearrangements, such as unbalanced chromosomal translocations involving the 8q arm, extra copies of the gene, or 8q isochromosomes. Therefore, these DF patterns should be cautiously interpreted as non-conclusive, and verified with a BA probe in order to avoid their misinterpretation by clinicians.

In our experience, the Vysis BA probe is the most sensitive of the three probes used in this study, and it guarantees the detection of most far telomeric 8q24 breaks. Moreover, as cutting artefacts and the overlap of nuclei in tissue sections generate both loss and fortuitous overlap of FISH signals, BA assays are

generally easier to interpret than DF tests. However, the Vysis BA probe would miss uncommon far centromeric breaks as well as cryptic insertions of IG into the *MYC* locus and vice versa.

In conclusion, taking into account the importance of *MYC* oncogene status both for BL diagnosis and for DLBCL prognosis and treatment, the study of *MYC* rearrangements requires that FISH approaches and probes be carefully selected. The design and limitations of each of the probes used in this determination should be especially borne in mind during *MYC* FISH pattern interpretation. Finally, *MYC* partner characterization should be as detailed as possible. Therefore, an optimal strategy to maximize detection of 8q24 abnormalities could be the initial use of a BA probe able to cover far telomeric breakpoints, followed by the application of an *IGH-MYC* DF probe and *IGK/IGL-MYC* DF probes when available.

Acknowledgements

The authors are grateful to the members of the Pathology Department of Hospital Germans Trias i Pujol for their invaluable support.

Disclosure

The authors state that they have no potential conflicts of interest.

References

1. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL et al. World Health Organization classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues, 4th edn. Lyon: IARC Press, 2008.
2. Salaverria I, Siebert R. The gray zone between Burkitt's lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma from a genetics perspective. *J. Clin. Oncol.* 2011; 29; 1835–1843.
3. Smith SM, Anastasi J, Cohen KS, Godley LA. The impact of *MYC* expression in lymphoma biology: beyond Burkitt lymphoma. *Blood Cells Mol. Dis.* 2010; 45; 317–323.
4. Barrans S, Crouch S, Smith A et al. Rearrangement of *MYC* is associated with poor prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated in the era of rituximab. *J. Clin. Oncol.* 2010; 28; 3360–3365.
5. Savage KJ, Johnson NA, Ben-Neriah S et al. *MYC* gene rearrangements are associated with a poor prognosis in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with R-CHOP chemotherapy. *Blood* 2009; 114; 3533–3537.

6. Johnson NA, Slack GW, Savage KJ et al. Concurrent expression of MYC and BCL2 in diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone. *J. Clin. Oncol.* 2012; 30; 3452-3459.
7. Green TM, Young KH, Visco C et al. Immunohistochemical double-hit score is a strong predictor of outcome in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone. *J. Clin. Oncol.* 2012; 30; 3460-3467.
8. Cuccuini W, Briere J, Mounier N et al. MYC+ diffuse large B-cell lymphoma is not salvaged by classical R-ICE or R-DHAP followed by BEAM plus autologous stem cell transplantation. *Blood* 2012; 119; 4619-4624.
9. Hecht JL, Aster JC. Molecular biology of Burkitt's lymphoma. *J. Clin. Oncol.* 2000; 18; 3707-3721.
10. Molyneux EM, Rochford R, Griffin B et al. Burkitt's lymphoma. *Lancet* 2012; 379; 1234-1244.
11. Hummel M, Bentink S, Berger H et al. A biologic definition of Burkitt's lymphoma from transcriptional and genomic profiling. *N. Engl. J. Med.* 2006; 354; 2419-2430.
12. Boerma EG, Siebert R, Kluin PM, Baudis M. Translocations involving 8q24 in Burkitt lymphoma and other malignant lymphomas: a historical review of cytogenetics in the light of today's knowledge. *Leukemia* 2009; 23; 225-234.
13. Joos S, Falk MH, Lichter P et al. Variable breakpoints in Burkitt lymphoma cells with chromosomal t(8;14) translocation separate c-myc and the IgH locus up to several hundred kb. *Hum. Mol. Genet.* 1992; 1; 625-632.
14. Joos S, Haluska FG, Falk MH et al. Mapping chromosomal breakpoints of Burkitt's t(8;14) translocations far upstream of c-myc. *Cancer Res.* 1992; 52; 6547-6552.
15. Busch K, Keller T, Fuchs U et al. Identification of two distinct MYC breakpoint clusters and their association with various IGH breakpoint regions in the t(8;14) translocations in sporadic Burkitt-lymphoma. *Leukemia* 2007; 21; 1739-1751.
16. Einerson RR, Law ME, Blair HE et al. Novel FISH probes designed to detect IGH-MYC and IGL-MYC rearrangements in B-cell lineage malignancy identify a new breakpoint cluster region designated BVR2. *Leukemia* 2006; 20; 1790-1799.
17. Bertrand P, Bastard C, Maingonnat C et al. Mapping of MYC breakpoints in 8q24 rearrangements involving non-immunoglobulin partners in B-cell lymphomas. *Leukemia* 2007; 21; 515-523.
18. Tapia G, Lopez R, Mu-noz-M. armol AM et al. Immunohistochemical detection of MYC protein correlates with MYC gene status in aggressive B cell lymphomas. *Histopathology* 2011; 59; 672-678.
19. Kluk MJ, Chapuy B, Sinha P et al. Immunohistochemical detection of MYC-driven diffuse large B-cell lymphomas. *PLoS ONE* 2012; 7; e33813.
20. Green TM, Nielsen O, de Stricker K, Xu-Monette ZY, Young KH, Møller MB. High levels of nuclear MYC protein predict the presence of MYC rearrangement in diffuse large B-cell lymphoma. *Am. J. Surg. Pathol.* 2012; 36; 612-619.
21. Fabris S, Storlazzi CT, Baldini L et al. Heterogeneous pattern of chromosomal breakpoints involving the MYC locus in multiple myeloma. *Genes Chromosom. Cancer* 2003; 37; 261-269.
22. van Rijk A, Mason D, Jones M et al. Translocation detection in lymphoma diagnosis by split-signal FISH: a standardised approach. *J. Hematop.* 2008; 1; 119-126.
23. Haralambieva E, Schuurin E, Rosati S et al. Interphase fluorescence in situ hybridization for detection of 8q24/MYC breakpoints on routine histologic sections: validation in Burkitt lymphomas from three geographic regions. *Genes Chromosom. Cancer* 2004; 40; 10-18.
24. Nagel I, Akasaka T, Klapper W et al. Identification of the gene encoding cyclin E1 (CCNE1) as a novel IGH translocation partner in t(14;19)(q32;q12) in diffuse large B-cell lymphoma. *Haematologica* 2009; 94; 1020-1023.
25. May PC, Foot N, Dunn R, Geoghegan H, Neat MJ. Detection of cryptic and variant IGH-MYC rearrangements in high-grade non-Hodgkin's lymphoma by fluorescence in situ hybridization: implications for cytogenetic testing. *Cancer Genet. Cytogenet.* 2010; 198; 71-75.
26. Xicoy B, Ribera JM, Mate J et al. Immunohistochemical expression profile and prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma with or without human immunodeficiency virus infection. *Leuk. Lymphoma* 2010; 51; 2063-2069.
27. Ventura RA, Martin-Subero JI, Jones M et al. FISH analysis for the detection of lymphoma-associated chromosomal abnormalities in routine paraffin-embedded tissue. *J. Mol. Diagn.* 2006; 8; 141-151.
28. Foot NJ, Dunn RG, Geoghegan H, Wilkins BS, Neat MJ. Fluorescence in situ hybridisation analysis of formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections in the diagnostic work-up of non-Burkitt high grade B-cell non-Hodgkin's lymphoma: a single centre's experience. *J. Clin. Pathol.* 2011; 64; 802-808.

29. Geiersbach K, Rector LS, Sederberg M et al. Unknown partner for USP6 and unusual SS18 rearrangement detected by fluorescence in situ hybridization in a solid aneurysmal bone cyst. *Cancer Genet.* 2011; 204; 195-202.

30. Mitelman F, Johansson B, Mertens F eds. Mitelman database of chromosome aberrations and gene fusions in cancer. 2012. <http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>.

4.3. Trabajo 3: La expresión de la proteína MYC se asocia a un peor pronóstico en el linfoma difuso de células grandes B primario del sistema nervioso central. APMIS. 2015;123(7):596-603

Resumen:

Recientemente se ha demostrado que el reordenamiento de los genes *MYC* y *BCL2*, así como la expresión de niveles elevados de las proteínas MYC y BCL2 se asocian a un peor pronóstico en el linfoma difuso de células grandes B sistémico (DLBCL). Sin embargo, su papel en el DLBCL primario del sistema nervioso central (CNS-DLBCL) ha sido evaluado en escasos estudios. En este trabajo nos propusimos estudiar el inmunofenotipo, el estado de los genes *MYC*, *BCL2* y *BCL6* y las características clínicas en una serie de 42 CNS-DLBCLs, así como valorar su posible significado pronóstico. Encontramos unos niveles elevados de expresión del gen *MYC* en el 43% de los casos, y esta expresión elevada se correlacionó con una menor supervivencia global (OS). La expresión de niveles elevados de MYC no es debida a la presencia de reordenamientos del gen, ya que no se demostró reordenamiento del gen *MYC* en ningún CNS-DLBCL. Los casos con coexpresión de niveles elevados de MYC y BCL2 mostraron una menor OS, si bien las diferencias no fueron estadísticamente significativas. En ningún caso se detectó traslocación del gen *BCL2*. El gen *BCL6* se encontraba reordenado con frecuencia (44% de los casos), pero la presencia de traslocaciones no se correlacionó con el pronóstico. En conclusión, el CNS-DLBCL con frecuencia presenta sobreexpresión del gen *MYC*, y esta sobreexpresión identifica un subgrupo de linfomas con comportamiento más agresivo. El estudio de la expresión del gen *MYC* mediante inmunohistoquímica puede ayudar a una valoración pronóstica más precisa en el CNS-DLBCL.

MYC protein expression is associated with poor prognosis in primary diffuse large B-cell lymphoma of the central nervous system

Gustavo Tapia,¹ Maria-Joao Baptista,² Ana-Maria Muñoz-Mármol,¹ Ayman Gaafar,³ Maria Puente-Pomposo,⁴ Olga García,² Ruth Marginet-Flinch,¹ Carolina Sanz,¹ José-Tomás Navarro,² Juan-Manuel Sancho,² Josep-Maria Ribera,² Aurelio Ariza¹ And José-Luis Mate¹

¹Department of Pathology, Hospital Germans Trias i Pujol, Universitat Autònoma de Barcelona, Badalona;

²Department of Hematology, ICO- Hospital Germans Trias i Pujol, Josep Carreras Leukaemia Research Institute, Universitat Autònoma de Barcelona, Badalona, Spain; ³Department of Pathology, Hospital Universitario Cruces, Barakaldo; and ⁴Department of Hematology, Hospital Universitario Cruces, Barakaldo, Spain

Tapia G, Baptista M-J, Muñoz-Mármol A-M, Gaafar A, Puente-Pomposo M, Garcia O, Marginet-Flinch R, Sanz C, Navarro J-T, Sancho J-M, Ribera J-M, Ariza A, Mate J-L. MYC protein expression is associated with poor prognosis in primary diffuse large B-cell lymphoma of the central nervous system. *APMIS* 2015; 123: 596–603

MYC and *BCL2* gene translocations and protein expression have recently demonstrated to be of prognostic significance in systemic diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL). However, their role in primary central nervous system DLBCL (CNS-DLBCL) prognosis has been scarcely analyzed. We studied the immunophenotype, the status of the *MYC*, *BCL2*, and *BCL6* genes and the clinical features of a series of 42 CNS-DLBCL and evaluated their prognostic significance. We found high *MYC* protein expression in 43% of cases, and this was associated with lower overall survival (OS). Cases with concurrent expression of *MYC* and *BCL2* showed a lower OS, although the difference did not reach statistical significance. Translocations involving the *MYC* or *BCL2* genes were not detected. The *BCL6* gene was frequently translocated, but was unrelated to survival. We conclude that *MYC* protein expression detected by immunohistochemistry identifies a CNS-DLBCL subset with worse prognosis and may contribute to a more accurate risk stratification of CNS-DLBCL patients.

Key words: *MYC*; *BCL2*; immunohistochemistry; prognosis; primary CNS lymphoma.

Gustavo Tapia, Department of Pathology, Hospital Germans Trias i Pujol, Carretera de Canyet s/n, 08916 Badalona, Barcelona, Spain. e-mail: gustavotapiam@hotmail.com

Primary central nervous system diffuse large B-cell lymphoma (CNS-DLBCL) is an aggressive non-Hodgkin's lymphoma (NHL) of the brain or spinal cord without evidence of systemic involvement at the time of diagnosis. Lymphomas occurring in the context of human immunodeficiency virus (HIV) infection or other immunodeficiency types are considered separately. CNS-DLBCL is an uncommon disease, accounting for <1% of all NHL (1). With regard to morphological and immunophenotypic features, CNS-DLBCL is quite a homogeneous entity, usually exhibiting a centroblastic appearance and a non-germinal center (non-GC) phenotype (CD10 negative, *BCL6* positive or negative, and MUM1 positive) (2). Despite these homogeneous characteristics, prognosis of CNS-DLBCL is variable and identification of robust biological prognostic markers are needed.

In recent years, it has been demonstrated that the *MYC* gene is translocated in 5–15% of systemic diffuse large

B-cell lymphomas (DLBCL). This genetic alteration resulted in poorer response to chemotherapy and worse prognosis, especially when occurring concomitantly with *BCL2* and/or *BCL6* translocations ("double-hit" and "triple-hit" lymphomas) (3–6). In addition, recent studies have shown that immunohistochemical detection of high *MYC* and *BCL2* protein expression is associated with an aggressive behavior and inferior overall survival (OS) regardless of the presence of *MYC* and *BCL2* rearrangements (7–11).

There are few studies on molecular changes in CNS-DLBCL, but the data reported indicate high frequencies of *BCL6* translocations and rare *MYC* and *BCL2* rearrangements (2, 12–14). As far as we know, there are no studies concurrently evaluating the frequency and impact on outcome of *MYC* and *BCL2* protein expression and their gene translocations in CNS-DLBCL. In this context, we aimed to investigate the prognostic impact of *MYC*, *BCL6*, and *BCL2* gene status

and the immunophenotypic profile (with special emphasis on MYC and BCL2 proteins) in a series of CNS-DLBCL arising in immunocompetent patients.

Materials and methods

PATIENT SELECTION AND CHARACTERISTICS

Pretreatment biopsies from patients with newly diagnosed CNS-DLBCL in immunocompetent patients were retrospectively retrieved from the Departments of Pathology of two institutions (Hospital Germans Trias I Pujol, Badalona, Spain and Hospital Universitario de Cruces, Barakaldo, Spain). Patients were diagnosed between January 1992 and February 2013 and all diagnoses were reviewed according to the WHO 2008 classification (1). Clinical information was collected from the medical records and included age, performance status according to the Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG), and serum lactate dehydrogenase (LDH) levels at the time of diagnosis, gender, type of treatment and date of the last follow up or death. The type of treatment was classified into two groups: A) chemotherapy (CT) alone or in combination with radiotherapy (RT) or autologous stem cell transplant; B) RT alone or palliative care. The study was approved by the Research Ethics Boards of our institutions, according to the Declaration of Helsinki.

TISSUE MICROARRAYS AND IMMUNOHISTOCHEMISTRY

Tissue samples were fixed in formaldehyde and embedded in paraffin using standard methods. Representative 1-mm cores of each case, in duplicate, were taken from tissue blocks, and two tissue microarrays (TMAs) were built using a microarrayer (Beecher instruments, Sun Prairie, WI, USA). Immunohistochemical stains were performed with the Dako EnVision™ system following the manufacturer's protocol. Monoclonal antibodies against CD20 (L26, 1/300; Dako, Glostrup, Denmark), CD3 (PS1, 1/30, Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK), CD10 (56C6, 1/20, Novocastra), BCL6 (PG-B6p, 1/30; Dako), BCL2 (124, 1/200; Dako), MUM1 (MUM1p, 1/40; Dako), Ki67 (MIB1, 1/800; Dako), and MYC (Y69, no.1472-1, 1/100; Eptomics, Inc., Burlingame, CA, USA) were used. Immunohistochemical stains were evaluated without knowledge of the patients' outcome or hybridization results, and scored as positive or negative. A cut-off of 30% positive cells was established for CD10, BCL6, and MUM1 following the criteria of Hans et al. (15) The Hans algorithm was applied to classify CNS-DLBCL cases according to the cell of origin; cases CD10 positive or BCL6 positive and MUM1 negative were considered to have a germinal center-like (GC) phenotype, and all other cases were considered to have a non-germinal

center-like (non-GC) phenotype (15). Although several new immunohistochemical-based algorithms have been proposed in the literature, the Hans algorithm is the most frequently used in previous studies in CNS-DLBCL, and was therefore used in the present study for comparative purposes. MYC, BCL2, and Ki67 immunostainings were evaluated in increments of 5%.

IN-SITU HYBRIDIZATION

Fluorescent in situ hybridization (FISH) was performed on sections from TMA blocks according to previously described methods (16). MYC rearrangements were evaluated by Vysis LSI MYC dual color, break-apart and Vysis LSI t(8;14) IGH/MYC, CEP8 Tri-color dual-fusion probes (Abbott Molecular, Abbott Park, IL, USA). Translocations involving the BCL2 and BCL6 genes were investigated using dual color BCL2 and BCL6 break-apart rearrangement probes (Abbott Molecular).

Epstein-Barr virus (EBV) infection was ruled out by chromogenic *in situ* hybridization with EBV-encoded RNA (EBERs) 1 and 2 oligonucleotide probes (EBER Histosonda, Cenbimo, Lugo, Spain) according to the manufacturer's instructions.

STATISTICAL ANALYSIS

Baseline characteristics were described as mean and standard deviation, or median and range, for quantitative variables and as frequency and percentage for categorical variables. The Chi-square, Fisher's exact, Student's t and Kruskal-Wallis tests were used when applicable for comparisons among these variables and among study groups. Survival curves were plotted according to the Kaplan-Meier method and were compared by the log-rank test. The Cox proportional hazard ratio model was used for univariate and multivariate survival analysis. Multivariate analysis was performed including the variables found to be predictive by univariate analysis ($p < 0.05$). OS was defined as the interval of time between the date of the diagnostic biopsy and the date of death or of last followup. Statistical analyses were carried out using the SPSS statistical package, version 18.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA). Statistical significance was considered with $p < 0.05$.

Results

PATIENTS' CHARACTERISTICS

The study cohort consisted of 42 CNS-DLBCL patients whose characteristics are summarized in Table 1. The median follow-up was 9 months range: 0.1–167.8) and the 2-year OS was 35% (95% CI, 19–51%). At the end of the study, 29 patients (69%) had died.

Table 1. Main clinical features of cases and their relation with MYC protein expression

	Whole series (n = 42)	MYC < 30 (n = 24)	MYC ≥ 30 (n = 18)	p value
Gender, n (%)				
Male/Female	22 (52)/20 (48)	13 (54)/11(46)	9 (50)/9 (18)	0.99
Age, years				
Median (Range)	66 (12–81)	68 (12/80)	64.5 (55–81)	0.232
Age ≥ 60, n (%)	28/42 (67)	15/24 (62)	13/18 (72)	0.742
Performance status, n (%)				
ECOG > 2	35/39 (90)	20/24 (83)	15/15 (100)	0.146
Elevated LDH, n (%)	10/25 (40)	8/19 (42)	2/6 (33)	0.99
Treatment				
CT ± RT ± Transplant	24/36 (67)	18/23 (78)	6/13 (46)	0.056
Immunophenotype				
CD10 positive, n (%)	3/42 (7)	3/24 (12)	0/18 (0)	0.247
BCL6 positive, n (%)	32/41 (78)	16/23 (70)	16/18 (89)	0.254
MUM1 positive, n (%)	42/42 (100)	24/24 (100)	18/18 (100)	–
BCL2 positive				
Median % (min, max)	80 (0, 80)	60 (0, 80)	80 (0, 80)	0.770
≥30, n (%)	29/41 (71)	17/23 (74)	12/18 (67)	0.734
Ki67, median % (min, max)	70 (40, 95)	70 (40, 95)	75 (40, 95)	0.497
MYC positive				
Mean % (SD)	29 (24)	NA	NA	–
Median % (min, max)	20 (5, 90)	NA	NA	–
≥30, n (%)	18/42 (43)	NA	NA	–
HANS algorithm, n (%)				
GC	3/42 (7)	3/24 (12)	0/18 (0)	0.247
non-GC	39/42 (93)	21/24 (88)	18/18 (100)	
FISH, n (%)				
BCL6 translocation	18/41 (44)	10/23 (43)	8/18 (44)	0.99
BCL2 translocation	0/41 (0)	0/23 (0)	0/18 (0)	–
MYC translocation	0/41 (0)	0/23 (0)	0/18 (0)	–

CT, chemotherapy; ECOG, Eastern Cooperative Oncology Group; GC, germinal center B-cell like; LDH, lactate dehydrogenase; MYC < 30, cases with a percentage of MYC positive cells inferior to 30%; MYC ≥ 30, cases with a percentage of MYC positive cells ≥30%; NA, not applicable; RT, radiotherapy.

IMMUNOHISTOCHEMISTRY AND MOLECULAR FEATURES

Data regarding the immunophenotype and molecular features are summarized in Table 1. Nearly all CNS-DLBCL were negative for CD10, and positive for both BCL6 and MUM1. Therefore, 93% of the cases were of the non-GC type according to the Hans algorithm. In 29 of 41 cases (71%) BCL2 was positive in more than 30% of neoplastic cells. The mean percentage of MYC positive neoplastic cells was 29%. After establishing the cut-off at 30% of positive tumor cells, MYC was seen to be positive in 18 of 42 cases (43%). Two representative cases are shown in Fig. 1. The percentage of Ki67 positive cells was higher in BCL6 positive than in BCL6 negative cases (median: 80% vs 60% respectively, $p = 0.002$). No correlation was found between the Ki67 index and the other immunohistochemical markers (CD10, MUM1, MYC) and FISH (MYC, BCL6, BCL2). EBERs was negative in all cases.

No translocation involving the *MYC* or *BCL2* gene was found in the 41 cases studied with breakapart probes (Table 1), although some cases showed copy gains or losses affecting *MYC* and *BCL2* loci. Regarding the

MYC locus, seven cases showed a moderate increase in the copy number (3–4 copies) and one case showed copy loss. An *IGH/MYC* translocation was not detected in any of the 35 cases evaluable with the dual-fusion probe. With respect to the *BCL2* locus, copy gains (3–9 copies) were found in 17 cases where as copy losses were not found in any case. The *BCL6* gene was rearranged in 44% of the cases, and five additional cases showed copy gains or losses.

FACTORS ASSOCIATED WITH CLINICAL OUTCOME

On univariate analysis, factors associated with poor OS were age over 60 years, high MYC protein expression (MYC ≥ 30), and type of treatment B (RT alone or palliative care) (Table 2, Fig. 2). On multivariate analysis, only the type of treatment and an interaction term between MYC protein expression and the type of treatment retained prognostic significance ($p = 0.012$ and $p = 0.046$, respectively).

Regarding clinical data, patients with ≥60 years of age showed lower 2-year OS rates than those with <60 years [28% (95% CI, 10–46%) vs 50% (95% CI, 21–79%),

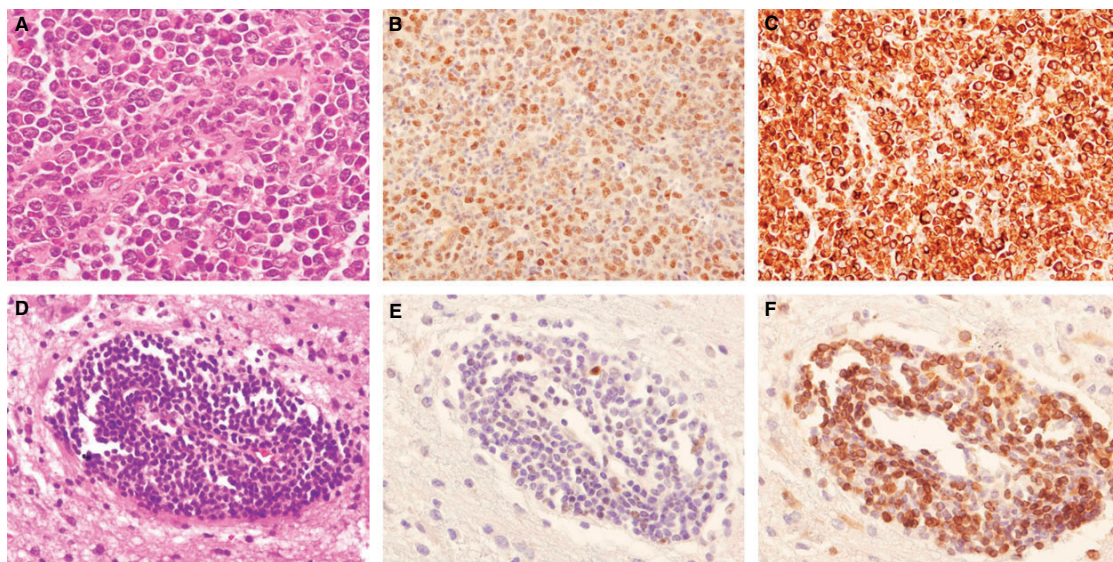


Fig. 1. Two representative examples of primary central nervous system diffuse large B-cell lymphomas. Patient 1: (A), hematoxylin and eosin stain showing large neoplastic cells with prominent nucleoli (original magnification $\times 200$), (B) MYC and (C) BCL2 stains showing a high percentage of positive cells protein expression (original magnification $\times 200$). Patient 2: (D) hematoxylin and eosin stain showing a perivascular pattern of infiltration (original magnification $\times 200$), (E) MYC stain showing a low percentage of positive cells (original magnification $\times 200$), and (F) BCL2 stain with a high percentage of positive cells (original magnification $\times 200$).

Table 2. Univariate and multivariate survival analysis of patients with CNS-DLBCL

Variable	Univariate analysis				Multivariate analysis ¹		
	Unfavorable category	HR	95% CI	p value	HR	95% CI	p value
Age	≥ 60 years	2.8	1.2–6.6	0.022	2.43	0.75–7.69	0.136
MYC expression	$\geq 30\%$ cells	2.2	1.03–4.9	0.041	1.92	0.53–6.67	0.319
MYC and BCL2 expression	$\geq 30\%$ cells	1.9	0.9–4.1	0.096			
Type of treatment	B	12.2	4.1–36.7	<0.001	4.66	1.14–18.96	0.032

B, surgery alone, radiotherapy alone or palliative care; CI, confidence interval; CNS-DLBCL, central nervous system diffuse large B-cell lymphoma; HR, hazard ratio.

¹The interaction term between MYC expression and treatment was statistically significant [HR = 6.26 (95% CI, 1.04–37.86); $p = 0.046$].

$p = 0.018$]. Type of treatment A was associated with better 2-year OS rates when compared to those type of treatment B [55% (95% CI, 32–78%) vs 0%, $p < 0.001$]. Although patients with an ECOG ≥ 2 had lower 2-year OS rates than those with an ECOG < 2 [32% (95% CI, 15–49%) vs 67% (95% CI, 14–100%), the difference did not reach statistical significance ($p = 0.114$).

Prognostic evaluation of the immunohistochemical features revealed that neither CD10, BCL6, and MUM1 expression nor the Ki67 index had an impact on prognosis. The cell of origin phenotype according to the Hans algorithm was also not correlated with prognosis. Several cut-off points of BCL2 protein expression were evaluated, including the previously reported values of 70%, 50%, and 30%, and none had an

impact on prognosis (7, 8). The prognostic significance of MYC protein expression was also evaluated using several cut-off points, such as the previously reported values of 40% and 10%, as well as the median (20%) and mean (30%) values of positive cells obtained in our series (7, 8, 10, 11). The 30% cut-off value showed the best correlation with survival. Cases with MYC $\geq 30\%$ had a significantly lower 2-year OS rates than those with MYC $< 30\%$ [18% (95% CI, 0–38%) vs 48% (95% CI, 26–70%), $p = 0.036$] (Fig. 2A). Of note, the clinical, immunophenotypic and molecular features of CNS-DLBCL cases with MYC ≥ 30 did not differ from those with MYC < 30 (Table 1). Despite MYC protein expression lost its prognostic value on multivariate analysis, the interaction term between MYC protein expression and the type of treatment had prognostic significance,

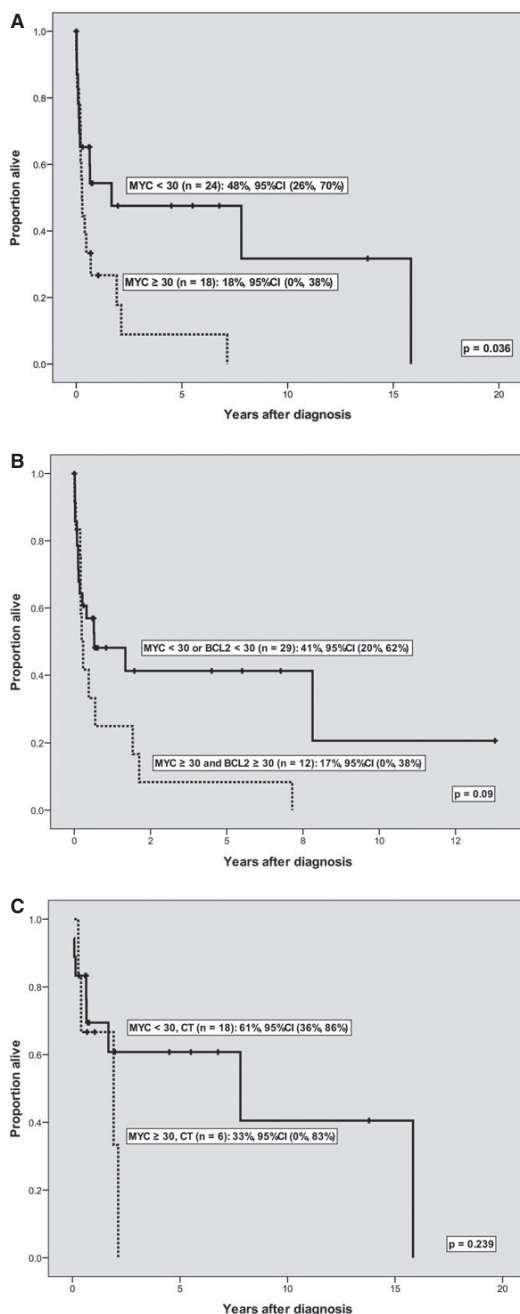


Fig. 2. Overall survival (OS) of patients with primary central nervous system diffuse large B-cell lymphoma. Kaplan–Meier curves represent the OS of the whole series (A) in relation to MYC protein expression. Patients with high MYC protein expression ($\geq 30\%$ of neoplastic cells) have a significantly worse outcome compared to those with low MYC protein expression ($< 30\%$ of neoplastic cells). Kaplan–Meier curves represent the OS of the whole series (B) in relation to concurrent MYC and BCL2 protein expression. Patients with concurrent high MYC and BCL2 protein expression ($\geq 30\%$ of neoplastic cells) had a significantly worse outcome compared to those with low MYC and / or BCL2 protein expression ($< 30\%$ of neoplastic cells). Kaplan–Meier curves represent the OS of patients treated with chemotherapy (C) in relation to MYC protein expression. Patients with high MYC protein expression ($\geq 30\%$ of neoplastic cells) had a worse outcome compared to those with low MYC protein expression ($< 30\%$ of neoplastic cells), although the difference was not statistically significant.

indicating that MYC expression was also relevant on multivariate analysis. To ascertain the effect of the type of treatment on the prognostic value of MYC protein expression, a survival analysis was performed in the subset of patients receiving treatment A. In this subset, cases with MYC ≥ 30 showed lower 2-year OS rates than those with MYC < 30 [33% (95% CI, 0–83%) vs 61% (95% CI, 36–86%), $p = 0.239$] (Fig. 2C). However, the difference was not statistically significant, probably due to the limited number of cases.

The effect of the concomitant expression of MYC and BCL2 proteins on OS was also evaluated. Cases with MYC ≥ 30 /BCL2 ≥ 30 showed lower 2-year OS rates than those with MYC < 30 and/or BCL2 < 30 , although the difference did not reach statistical significance [17% (95% CI, 0–38%) vs 41% (95% CI, 20–62%) respectively, $p = 0.096$] (Fig. 2B).

Finally, the presence of *BCL6* translocation was not related to survival [2-year OS: 38% (95% CI, 11–65%) in *BCL6* translocated cases vs 34% (95% CI, 14–54%) in *BCL6* non-translocated cases; $p = 0.664$]. Since MYC and BCL2 were not translocated in any case, prognostic evaluation was not applicable for these variables.

Discussion

The data of the present study indicate that MYC protein expression has prognostic value in CNS-DLBCL in immunocompetent patients, similar to what has recently been reported for systemic DLBCL (7–11). Moreover, we found a trend to a lower OS in CNS-DLBCL with concomitant expression of high MYC and BCL2 proteins.

In systemic DLBCL, it is well-established that cases with MYC gene translocations have a bad prognosis and worse response to chemotherapy regimens, es-

pecially those cases harboring *MYC* gene rearrangements concurrently with *BCL6* and/or *BCL2* rearrangements (“double-hit” and “triple-hit” lymphomas) (3–6). We observed that *MYC* and *BCL2* were not rearranged in the present CNS-DLBCL series, in agreement with a few previous studies in the literature reporting low frequency of rearrangements of *MYC* and *BCL2*, and thus are not useful prognostic tools in CNS-DLBCL (2, 12–14). Interestingly, a low frequency of *MYC* and *BCL2* translocation and a high frequency of *BCL6* rearrangement have also been found in primary testicular DLBCL, another immune privileged site. Moreover, primary testicular DLBCL and CNS-DLBCL share a predominant non-GC phenotype characterized by activation of the NFκB pathway(17).

Recent studies have shown that nodal DLBCL that carry *MYC* translocations show *MYC* protein overexpression, although some cases devoid of *MYC* gene rearrangements have also shown high *MYC* protein expression (18, 19). There is increasing evidence that systemic DLBCL with high *MYC* and *BCL2* protein expression has a bad prognosis, independently of gene status (7–11). In the present study, we found that CNS-DLBCL frequently show high *MYC* protein expression (43% of cases), consistent with a previous study and with the high *MYC* mRNA levels found in CNS-DLBCL by gene expression arrays (14, 20). High *MYC* protein expression was not related to *MYC* translocation (absent in all instances) or copy gains (found in 19.5% of cases), and could be due to alternative gene activation and/or transcriptional up-regulation mechanisms. Interestingly, a recent study has reported the up-regulation of some micro-RNAs related to the *MYC* pathway in CNS-DLBCL in comparison with nodal DLBCL, a finding that could explain *MYC* protein overexpression in CNS-DLBCL (21).

High *MYC* protein expression was predictive of worse OS in our series of CNS-DLBCL patients (2-years OS: 18% vs 48%). Of note, cases with low and high *MYC* expression were not different in terms of age, performance status, other immunophenotypic features or any of the remaining parameters evaluated. Our results show that *MYC* protein expression assessed by immunohistochemistry is a putative prognostic marker in CNS-DLBCL. This is in contrast with a recent study in which *MYC* expression was not found to be of prognostic value (22). This could be due to differences in the population of study or to the disparity of cut-offs used for *MYC* expression; Rubinstein et al. applied the eligible criterion of ECOG ≤ 2 and a 50% cut-off whereas our series included all patients independently of ECOG and a 30% cut-off was used (22). This fact highlights the importance of standardizing the *MYC* expression cut-off value in CNS-DLBCL to use this protein as a prognostic marker.

In our work *BCL2* protein expression was not related to survival but, we did detect a trend to a lower 2-year OS than cases with low expression of *MYC* and/or *BCL2* in CNS-DLBCL cases with concomitant expression of *MYC* and *BCL2* (defined as *MYC* ≥ 30 and *BCL2* ≥ 30). To our knowledge, this is the first study to assess the prognostic role of concomitant expression of *MYC* and *BCL2*, and further data are needed to elucidate the prognostic value of the co-expression of both markers.

BCL6 protein expression was not of prognostic value in our series which is consistent with the largest report to date on CNS-DLBCL (23). Notwithstanding, *BCL6* expression has been reported to be a prognostic factor for survival in other series (24, 25). In addition, *BCL6* gene rearrangements were not predictive of worse survival in the present CNS-DLBCL series, as opposed to a previous study (13). Of note, the frequency of *BCL6* rearrangements in the study by Cady et al. was lower than ours (17% vs 44%) which could influence the impact of *BCL6* rearrangements on survival (13). Therefore, further studies in larger series are needed to ascertain the importance of *BCL6* rearrangement in predicting outcome.

In summary, the present data demonstrate the importance of studying *MYC* protein expression for accurate prognostic stratification of CNS-DLBCL patients. Moreover, our results indicate the need to assess the prognostic value of *MYC* and *BCL2* co-expression in larger series. In addition, we have confirmed the low interest of studying *MYC* and *BCL2* translocations in CNS-DLBCL since they are absent in almost all cases. The present study was limited by several factors. Due to its retrospective nature, the medical records of some patients did not contain information related to all the variables studied. Furthermore, treatments were heterogeneous, but 67% of patients received the currently recommended CT regimens for this pathology, supporting the results of survival analysis.

Conflicts of interest

The authors disclose that they have no significant relationships with or financial interest in any commercial companies pertaining to this article.

This study was supported by grants 02/1210 from Marat_o TV3 and EC11-041 from Ministerio de Sanidad, Política Social e Igualdad, Spain.

References

1. Kluijn PM, Deckert M, Ferry JA. Primary diffuse large B-cell lymphoma of the CNS. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW, editors. Tumours of Haematopoietic and

- Lymphoid Tissues, 4th edn. Lyon: IARC, 2008: 240–1.
2. Hattab EM, Martin SE, Al-Khatib SM, Kupsy WJ, Vance GH, Stohler RA, et al. Most primary central nervous system diffuse large B-cell lymphomas occurring in immunocompetent individuals belong to the nongerminal center subtype: a retrospective analysis of 31 cases. *Mod Pathol* 2010;23:235–43.
 3. Barrans S, Crouch S, Smith A, Turner K, Owen R, Patmore R, et al. Rearrangement of MYC is associated with poor prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated in the era of rituximab. *J Clin Oncol* 2010;28:3360–5.
 4. Savage KJ, Johnson NA, Ben-Neriah S, Connors JM, Sehn LH, Farinha P, et al. MYC gene rearrangements are associated with a poor prognosis in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with R-CHOP chemotherapy. *Blood* 2009;114:3533–7.
 5. Johnson NA, Savage KJ, Ludkovski O, Ben-Neriah S, Woods R, Steidl C, et al. Lymphomas with concurrent BCL2 and MYC translocations: the critical factors associated with survival. *Blood* 2009;114:2273–9.
 6. Snuderl M, Kolman OK, Chen YB, Hsu JJ, Ackerman AM, Dal Cin P, et al. B-cell lymphomas with concurrent IGH-BCL2 and MYC rearrangements are aggressive neoplasms with clinical and pathologic features distinct from Burkitt lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Surg Pathol* 2010;34:327–40.
 7. Green TM, Young KH, Visco C, Xu-Monette ZY, Orazi A, Go RS, et al. Immunohistochemical double-hit score is a strong predictor of outcome in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone. *J Clin Oncol* 2012;30:3460–7.
 8. Johnson NA, Slack GW, Savage KJ, Connors JM, Ben-Neriah S, Rogic S, et al. Concurrent expression of MYC and BCL2 in diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone. *J Clin Oncol* 2012;30:3452–9.
 9. Hu S, Xu-Monette ZY, Tzankov A, Green T, Wu L, Balasubramanyam A, et al. MYC/BCL2 protein coexpression contributes to the inferior survival of activated B-cell subtype of diffuse large B-cell lymphoma and demonstrates high-risk gene expression signatures: a report from The International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program. *Blood* 2013;121:4021–31.
 10. Horn H, Ziepert M, Becher C, Barth TF, Bernd HW, Feller AC, et al. MYC status in concert with BCL2 and BCL6 expression predicts outcome in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2013;121:2253–63.
 11. Valera A, Lopez-Guillermo A, Cardesa-Salzmann T, Climent F, Gonzalez-Barca E, Mercadal S, et al. MYC protein expression and genetic alterations have prognostic impact in diffuse large B-cell lymphoma treated with immunochemotherapy. *Haematologica* 2013;98:1554–62.
 12. Montesinos-Rongen M, Zühlke-Jenisch R, Gesk S, Martin-Subero JL, Schaller C, Van Roost D, et al. Interphase cytogenetic analysis of lymphoma-associated chromosomal breakpoints in primary diffuse large B-cell lymphomas of the central nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol* 2002;61:926–33.
 13. Cady FM, O'Neill BP, Law ME, Decker PA, Kurtz DM, Giannini C, et al. Del(6)(q22) and BCL6 rearrangements in primary CNS lymphoma are indicators of an aggressive clinical course. *J Clin Oncol* 2008;26:4814–9.
 14. Brunn A, Nagel I, Montesinos-Rongen M, Klapper W, Vater I, Paulus W, et al. Frequent triple-hit expression of MYC, BCL2, and BCL6 in primary lymphoma of the central nervous system and absence of a favorable MYC(low)BCL2 (low) subgroup may underlie the inferior prognosis as compared to systemic diffuse large B cell lymphomas. *Acta Neuropathol* 2013;126:603–5.
 15. Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, Gascoyne RD, Delabie J, Ott G, et al. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood* 2004;103:275–82.
 16. Muñoz-Mármol AM, Sanz C, Tapia G, Marginet R, Ariza A, Mate JL. MYC status determination in aggressive B-cell lymphoma: the impact of FISH probe selection. *Histopathology* 2013;63:418–24.
 17. Menter T, Ernst M, Drachneris J, Dirnhöfer S, Barghorn A, Went P, et al. Phenotype profiling of primary testicular diffuse large B-cell lymphomas. *Hematol Oncol* 2014;32:72–81.
 18. Tapia G, Lopez R, Muñoz-Mármol AM, Mate JL, Sanz C, Marginet R, et al. Immunohistochemical detection of MYC protein correlates with MYC gene status in aggressive B cell lymphomas. *Histopathology* 2011;59:672–8.
 19. Green TM, Nielsen O, de Stricker K, Xu-Monette ZY, Young KH, Moller MB. High levels of nuclear MYC protein predict the presence of MYC rearrangement in diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Surg Pathol* 2012;36:612–9.

20. Rubenstein JL, Fridlyand J, Shen A, Aldape K, Ginzinger D, Batchelor T, et al. Gene expression and angiotropism in primary CNS lymphoma. *Blood* 2006;107:3716–23.

21. Fischer L, Hummel M, Korfel A, Lenze D, Joehrens K, Thiel E. Differential micro-RNA expression in primary CNS and nodal diffuse large B-cell lymphomas. *Neuro-Oncology* 2011;13:1090–8.

22. Rubenstein JL, Hsi ED, Johnson JL, Jung SH, Nakashima MO, Grant B, et al. Intensive chemotherapy and immunotherapy in patients with newly diagnosed primary CNS lymphoma: CALGB 50202 (Alliance 50202). *J Clin Oncol* 2013;31:3061–8.

23. Camilleri-Br oet S, Crini_ere E, Br oet P, Delwail V, Mokhtari K, Moreau A, et al. A uniform activated B- cell-like immunophenotype might explain the poor prognosis of primary central nervous system lymphomas: analysis of 83 cases. *Blood* 2006;107:190–6.

24. Levy O, DeAngelis LM, Filippa DA, Panageas KS, Abrey LE. BCL-6 predicts improved prognosis in primary central nervous system lymphoma. *Cancer* 2008;112:151–6.

25. Braaten KM, Betensky RA, de Leval L, Okada Y, Hochberg FH, Louis DN, et al. BCL-6 expression predicts improved survival in patients with primary central nervous system lymphoma. *Clin Cancer Res* 2003;9:1063–9.

5. Discusión



5. Discusión

La importancia del gen *MYC* en la etiopatogenia del linfoma de Burkitt (BL), y por lo tanto, en su diagnóstico, es conocida desde hace décadas. A lo largo de los últimos años, se ha puesto de manifiesto que el gen *MYC* y su proteína juegan también un papel importante en otros procesos linfoproliferativos agresivos de células B, como el linfoma difuso de células grandes B (DLBCL), linfomas inclasificables de características intermedias entre BL y DLBCL (BCLU) o el linfoma plasmablastico, entre otros. Dada su relevancia en el diagnóstico y, como se ha demostrado posteriormente, en la valoración pronóstica de los linfomas agresivos de células B, en la presente tesis nos planteamos estudiar diferentes aspectos del gen *MYC* y la proteína MYC en linfomas agresivos. Así, en el primer trabajo de la tesis nos centramos en la relación entre la existencia de reordenamiento génico y la expresión proteica de MYC, valorada mediante técnicas inmunohistoquímicas, en el segundo trabajo valoramos diferentes sondas de FISH para la determinación del *status* del gen y los resultados discordantes obtenidos entre ellas, y en el tercer trabajo evaluamos el valor pronóstico de la expresión de la proteína MYC en un subtipo de DLBCL, el DLBCL primario del sistema nervioso central (CNS-DLBCL).

En el **primer trabajo** de esta tesis estudiamos la expresión de la proteína MYC y de otros marcadores inmunohistoquímicos (CD20, CD3, CD10, BCL6, BCL2 y MUM1), así como el subtipo molecular según el algoritmo de Hans, en una serie de 56 linfomas

agresivos de células B en los que el estado del gen *MYC* era conocido. La serie estaba constituida por 9 BL (8 casos con traslocación del gen *MYC*), 45 DLBCL (9 casos con traslocación del gen *MYC*) y 2 BCLU (los dos con traslocación del gen *MYC*). En el análisis observamos una correlación entre la expresión de la proteína MYC, evaluada mediante técnicas inmunohistoquímicas, y el *status* del gen. Así, los casos con traslocación del gen *MYC* (*MYC+*) mostraban un porcentaje de células neoplásicas positivas para la proteína MYC superior a aquellos sin traslocación del gen (*MYC-*) (70% vs. 28% respectivamente), independientemente del diagnóstico. Esta correlación se mantenía al considerar únicamente los DLBCL (61% vs. 28% en *MYC+*-DLBCL vs. *MYC-*-DLBCL respectivamente). Los niveles de expresión de MYC no se correlacionaron con el resto de parámetros inmunohistoquímicos evaluados ni con el subtipo molecular (Hans).

La relación entre el *status* del gen *MYC* y los niveles de expresión proteica detectados mediante técnicas inmunohistoquímicas había sido evaluada recientemente por Ruzinova *et al* (Ruzinova, Caron e Rodig, 2010) en una serie de 46 linfomas agresivos (17BL, 19 *MYC+*-DLBCL, 5 *MYC-*-DLBCL, 1 *MYC+*-BCLU y 1 *MYC-*-BCLU). Estos investigadores observaron que los casos *MYC+* mostraban una tinción inmunohistoquímica de patrón nuclear (o mixto nuclear y citoplasmático), mientras que los casos *MYC-* mostraban una tinción inmunohistoquímica de patrón citoplasmático exclusivamente, por lo que concluyeron

que la tinción nuclear para MYC permitía identificar los linfomas MYC+. En cambio, en nuestro trabajo no observamos tinción citoplasmática en ningún caso, a pesar de que el anticuerpo utilizado era el mismo. Estas diferencias podrían explicarse por la utilización de diferente metodología (método de recuperación antigénica, condiciones de fijación de la muestra, etc). Estudios posteriores han reportado una tinción exclusivamente nuclear, y han corroborado la relación entre la detección de reordenamiento del gen MYC y altos niveles de expresión proteica mediante técnicas inmunohistoquímicas (Green, Nielsen, *et al.*, 2012; Kluk *et al.*, 2012).

La presencia de ganancia de copias / amplificaciones no se correlacionó con mayor porcentaje de positividad para MYC. Los casos con un aumento del número de copias del gen MYC, pero sin traslocación, presentaban un 31% de células MYC positivas, mientras que los casos sin alteraciones génicas (sin reordenamiento ni ganancia de copias) presentaban un 28% de células MYC positivas. Este aspecto no ha sido valorado extensamente, si bien algunos autores han encontrado una tendencia a una mayor expresión de MYC en los casos con ganancia de copias respecto a aquellos sin alteraciones génicas (Bellas *et al.*, 2014).

En nuestra serie, algunos linfomas MYC mostraban un elevado porcentaje de células MYC positivas (hasta el 80%), a pesar de la ausencia de reordenamiento o ganancia de copias del gen (figura 15). Estudios posteriores han obtenido resultados similares, si bien el porcentaje de estos casos varía según las series, y según el punto de corte que se haya utilizado para definir la sobreexpresión de MYC (Green, Young *et al.* 2012; Green, Nielsen, *et al.*, 2012; Johnson

et al., 2012; Kluk *et al.*, 2012). El mecanismo mediante el cual se produce esta sobreexpresión en ausencia de reordenamiento o ganancia de copias / amplificación es desconocido, y podría ser debido a una alteración en los mecanismos de regulación de la activación del gen, ya sea a nivel transcripcional o post-transcripcional. En este sentido, se ha demostrado que la activación de la vía JAK-STAT3 puede producir una regulación positiva de MYC, en ausencia de alteraciones génicas, y constituye el mecanismo de sobreexpresión de MYC en los DLBCL ALK+ (Sarosiek *et al.*, 2010; Valera, Colomo, *et al.*, 2013; Pasqualucci *et al.*, 2001).

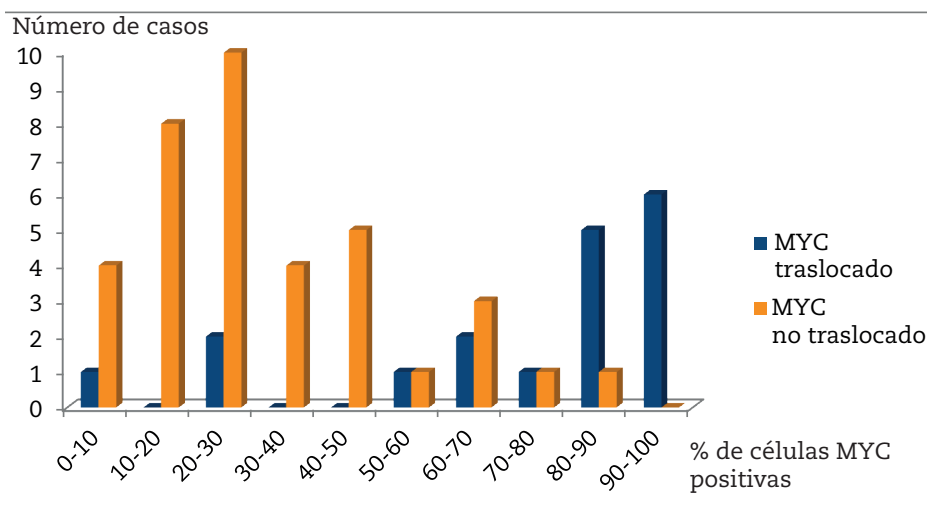
En contrapartida, en nuestro trabajo observamos 3 linfomas MYC+ de 19 (15,8%) que mostraban un porcentaje bajo (inferior al 40%) de células MYC positivas en el estudio inmunohistoquímico (datos no reportados) (figura 15). De igual forma, Johnson *et al* estudiaron 290 DLBCL, y en 9 casos de 34 (24,5%) MYC+DLBCL, el porcentaje de células MYC positivas fue inferior al 40% (Johnson *et al.*, 2012). Otros autores no han encontrado esta discorrelación entre la expresión proteica y el *status* del gen MYC (Green, Nielsen, *et al.*, 2012; Kluk *et al.*, 2012). La causa de esta falta de correlación entre expresión y reordenamiento no es conocida. Sin embargo, se sabe que hasta el 30% de los DLBCL sufren mutaciones en el gen MYC, que podrían influir sobre los mecanismos de regulación post-transcripcional, la degradación o la configuración tridimensional de la proteína MYC que disminuyan o eliminen totalmente la afinidad del anticuerpo monoclonal utilizado por el epítipo correspondiente (Pasqualucci *et al.*, 2001; Meyer e Penn, 2008). Este mecanismo, en que la presencia de mutaciones provoca la pérdida de sensibilidad del anticuerpo monoclonal utilizado, ha sido descrito

recientemente para la proteína BCL2. Así, de una serie de 22 LF negativos para BCL2 con el anticuerpo monoclonal habitual, 11 casos mostraban reordenamiento del gen BCL2 mediante FISH y en 10 de ellos pudo demostrarse positividad para BCL2 mediante otros anticuerpos monoclonales. En estos casos se demostró la presencia de

nante antigénico y que puedan influir en esta discorrelación en algún caso.

Así, en el primer trabajo de la tesis demostramos que el reordenamiento del gen *MYC* se correlaciona con unos niveles de expresión proteica elevados, si bien la correlación no es absoluta ya que algunos casos

Figura 15: Relación entre el porcentaje de células MYC positivas y la presencia o no de reordenamiento del gen *MYC*.



mutaciones en el epítipo reconocido por el primer anticuerpo, que explicaría la pérdida de sensibilidad del mismo (Adam et al., 2013). Resultaría interesante evaluar la sensibilidad de diferentes anticuerpos frente a la proteína MYC en una serie de linfomas agresivos con reordenamiento del gen *MYC* y niveles de expresión bajos con la clona Y69, con tal de explorar esta posibilidad. Finalmente, no se puede descartar la existencia de problemas de fijación de la muestra que afecten a la preservación del determi-

MYC+ expresan niveles bajos de la proteína. Por otro lado, existe un subgrupo de *MYC*-DLBCL que sobreexpresan la proteína MYC por mecanismos alternativos no bien conocidos.

A continuación nos planteamos estudiar si el uso de diferentes sondas comerciales para la determinación de reordenamientos del gen *MYC* podía influir en la valoración del estado del gen. En el **segundo trabajo** de esta tesis utilizamos tres sondas dife-

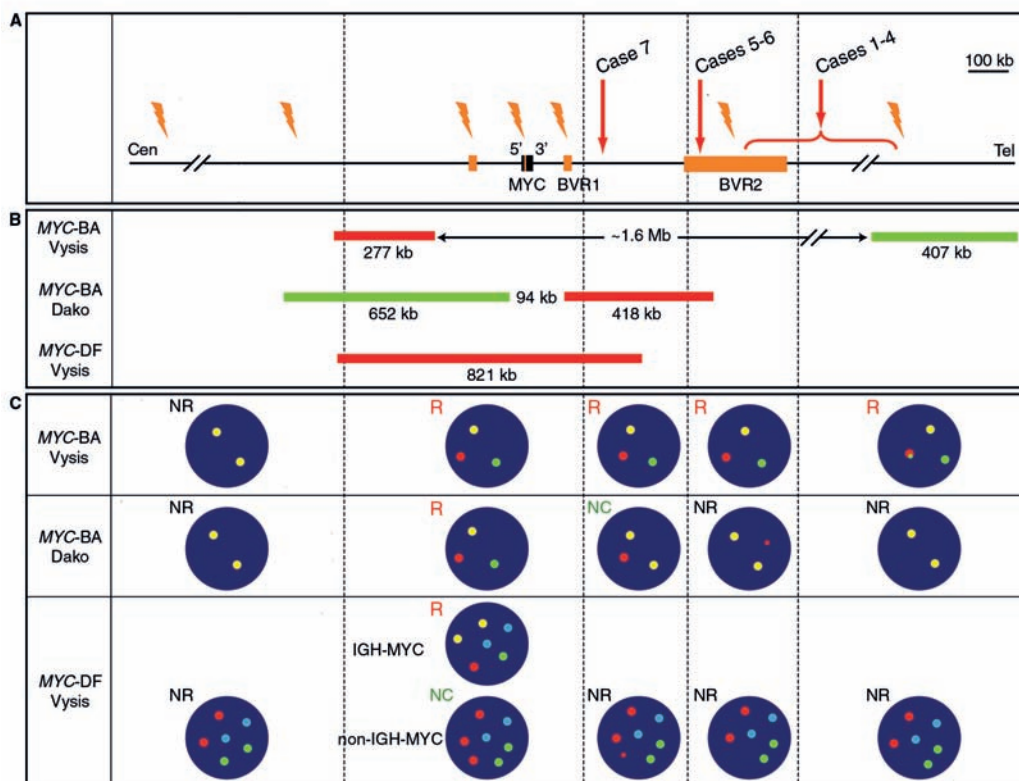
rentes en una serie de linfomas agresivos: una sonda de fusión *IGH-MYC* (Vysis) y dos sondas de separación o *break-apart* (Vysis y Dako). De los 85 casos evaluables con las tres sondas (9 BL, 75 DLBCL y 1 BCLU), 26 presentaron traslocación del gen *MYC*. La mitad de los casos reordenados (13/26) correspondían a una traslocación *IGH-MYC* (13/26), como demostró la sonda de fusión, y todos ellos pudieron detectarse de forma inequívoca con las tres sondas evaluadas. Los puntos de rotura descritos en la mayoría de los reordenamientos *IGH-MYC* (denominados de clase I, II y III) se sitúan en posición 5' (centromérica) al gen, o bien en el primer intrón o el primer exón del gen *MYC* (Joos, Falk, *et al.*, 1992; Joos, Haluska, *et al.*, 1992; Busch *et al.*, 2007). Esta región se encuentra cubierta por las tres sondas diferentes evaluadas en nuestro estudio, por lo que cualquiera de ellas es capaz de detectar la mayor parte de los reordenamientos t(8;14)(q24;q32), que constituyen aproximadamente el 80% de las traslocaciones observadas en el BL (figura 16).

Por el contrario, en 7 de los 13 casos (54%) con reordenamiento no-*IGH-MYC* (*IGK-MYC*, *IGL-MYC* o no-*IG-MYC*), la traslocación pudo detectarse de forma inequívoca únicamente con la sonda de separación de Vysis. El resultado obtenido con las otras sondas fue equívoco, no concluyente o negativo. De los 7 casos, 3 probablemente eran el resultado de una rotura en la porción centromérica (5') de la región BVR2, que se sitúa en el límite cubierto por la sonda de fusión de Vysis y la de separación de Dako, y dieron un resultado equívoco o negativo con las mismas (figura 16). Los 4 casos restantes probablemente representaban una rotura en la porción telomérica de la región BVR2 o bien aun más alejada 3' del gen, lejos de la región cubierta por la sonda de fusión

de Vysis y la de separación de Dako. Por ello, solo pudieron detectarse con la sonda de separación de Vysis, que cubre una región más amplia del gen. Las traslocaciones variantes del gen *MYC*, que afectan a los genes *IGK*, *IGL* o a genes no-*IG* como *PAX5* o *BCL6*, habitualmente se producen por la rotura del gen *MYC* en posición 3' (Einerson *et al.*, 2006; Bertrand *et al.*, 2007; Aukema *et al.*, 2014). Este tipo de traslocaciones son infrecuentes en el BL (menos del 20%), pero constituyen hasta el 50% en los *MYC*+DLBCL. Así, en este contexto la utilización de sondas FISH que no cubren una región amplia del extremo 3' del gen puede dar lugar a falsos negativos, por lo que es preferible un abordaje con sondas con una separación amplia entre ambas sondas verde y roja, que cubran al menos los puntos de rotura más frecuentes, incluyendo las regiones BVR1 y BVR2, como la de Vysis.

Finalmente, 9 de los 15 casos (60%) con un patrón sugestivo de traslocación no-*IGH-MYC* con la sonda de fusión *IGH-MYC* eran debidos a ganancia de copias del gen *MYC*, y no a la presencia de reordenamiento, tal y como se demostró con las dos sondas de separación (falso positivo). En estos casos, con la sonda de fusión *IGH-MYC* se detectó una relación *MYC/CEP8* aumentada (relación entre las señales correspondientes al gen *MYC* y las correspondientes al centrómero del cromosoma 8). Este patrón puede ser debido al reordenamiento de *MYC* con un gen diferente a la *IGH*, pero también puede ser motivado por otras alteraciones cromosómicas como ganancia de copias del gen, isocromosomas 8q o traslocaciones cromosómicas no balanceadas que afecten al brazo 8q. Teniendo en cuenta que muchos DLBCL presentan un cariotipo complejo, este patrón observado con las sondas de fusión *IGH-MYC* debe inter-

Figura 16: Distribución de los puntos de rotura en la región 8q24 (A), las regiones cubiertas por las tres sondas de FISH evaluadas (B) y los patrones observados con las mismas (C).



Flechas verticales rojas indican los puntos de rotura en casos discretantes. Los rayos naranjas indican los puntos de rotura descritos en la literatura. Los recuadros naranjas indican los puntos de rotura mas frecuentes. BVR1 y 2: Regiones variantes de Burkitt 1 y 2. NC: no concluyente. NR: no reordenado. R: reordenado

pretarse con cautela en el contexto de los DLBCL.

En nuestra serie no detectamos ningún reordenamiento que fuera evidente únicamente con la sonda de fusión *IGH-MYC*. Esta posibilidad, si bien es excepcional, ha sido descrita en inserciones crípticas o en

puntos de rotura en posición 5' muy alejadas del gen *MYC* (Nagel *et al.*, 2009; May *et al.*, 2010) (figura 16). Posteriormente a la publicación de este trabajo, en la práctica diaria de nuestro laboratorio diagnóstico hemos tenido la oportunidad de observar un linfoma B agresivo con un reordenamiento del gen *MYC* de estas característi-

cas, que pudo determinarse únicamente con la sonda de fusión.

En conclusión, los resultados obtenidos en el segundo estudio nos hacen proponer la utilización de una sonda FISH de separación que cubra una región amplia del extremo 3' del gen y otra de fusión *IGH-MYC* a la hora de valorar la presencia de alteraciones en la banda cromosómica 8q24, especialmente si estamos ante un probable DLBCL o un BCLU en los que los reordenamientos variantes son frecuentes. De esta forma podremos detectar prácticamente la totalidad de las traslocaciones de *MYC*, independientemente del *partner*, evitando posibles falsos negativos y positivos.

En el **tercer trabajo** de la tesis nos propusimos estudiar las alteraciones del gen *MYC* y los niveles de expresión proteica de *MYC* en el DLBCL primario del sistema nervioso central (CNS-DLBCL), un subtipo de DLBCL con un comportamiento especialmente agresivo. El papel pronóstico del reordenamiento del gen *MYC* en los DLBCL sistémicos, aislado o especialmente en asociación con el reordenamiento de *BCL2* o *BCL6*, había sido bien establecido en la literatura (Savage *et al.*, 2009; Barrans *et al.*, 2010; Snuderl *et al.*, 2010). Además, estudios recientes indicaban que los casos con coexpresión de niveles elevados de las proteínas *MYC* y *BCL2* tenían un comportamiento clínico más agresivo y un peor pronóstico, tanto si eran debidos a reordenamiento del gen como si no (Green, Young, *et al.*, 2012; Johnson *et al.*, 2012). Los estudios moleculares en CNS-DLBCL eran muy escasos y, aunque señalaban una baja frecuencia de traslocación de *MYC* y *BCL2*, y elevada de *BCL6* (Montesinos-Rongen *et al.*, 2002; Cady *et al.*, 2008; Hattab *et al.*, 2010), existían datos indirectos que podrían indicar una sobreexpresión de la

proteína *MYC* en ausencia de reordenamiento (Montesinos-Rongen *et al.*, 2002; Cady *et al.*, 2008; Hattab *et al.*, 2010). Así, Rubenstein *et al.* habían reportado unos niveles de mRNA de *MYC* superiores en los CNS-DLBCL respecto a los DLBCL nodales mediante *arrays* de expresión (Rubenstein *et al.*, 2006), y Fischer *et al.* habían observado sobreexpresión de un perfil de miRNA relacionados con *MYC* en los CNS-DLBCL en comparación con los DLBCL nodales (Fischer *et al.*, 2011; Rubenstein *et al.*, 2006; Fischer *et al.*, 2011).

En nuestro estudio, evaluamos el inmunofenotipo, el subtipo molecular, el estado de los genes *MYC*, *BCL2* y *BCL6* y las características clínicas de una serie de 42 CNS-DLBCL, así como el posible significado pronóstico de estas variables. La mayor parte de los casos expresaban un fenotipo no-GC (Hans), con negatividad para CD10 (97%), y positividad para *BCL6* (78%) y MUM1 (100%), datos similares a los datos reportados en la literatura (Hattab *et al.*, 2010; Preusser *et al.*, 2010). Ninguno de estos marcadores o el subtipo molecular se correlacionó con la supervivencia global (OS). En este sentido, algunos autores habían señalado un mejor pronóstico en los casos con expresión de *BCL6*, mientras que otros no observaron esta correlación (Braaten *et al.*, 2003; Camilleri-Broët *et al.*, 2006; Levy *et al.*, 2008).

Respecto a las alteraciones moleculares, el gen *BCL6* se encontraba reordenado en el 44% de los casos, una frecuencia superior a la reportada previamente. Además, no se observó correlación entre la presencia de traslocación de *BCL6* y un peor pronóstico, a diferencia de lo descrito por Cady *et al.* (Cady *et al.*, 2008). En ningún caso se detectó reordenamiento de los genes *MYC* y *BCL2*, en concordancia con la baja frecuen-

cia de traslocaciones en estos genes descrita en la literatura (Montesinos-Rongen *et al.*, 2002; Cady *et al.*, 2008; Hattab *et al.*, 2010).

A pesar de la ausencia de reordenamientos, en el 43% y el 71% de los casos se detectaron niveles de expresión elevados de las proteínas MYC y BCL2 respectivamente (definidos como positividad en $\geq 30\%$ de las células neoplásicas). Esta coexpresión elevada de MYC y de BCL2 en un porcentaje elevado de CNS-DLBCL había sido reportada recientemente por Brunn y Rubenstein en dos series independientes de 44 y 50 casos respectivamente (Brunn *et al.*, 2013; Rubenstein *et al.*, 2013). Cabe destacar que el porcentaje de casos con coexpresión de MYC en el CNS-DLBCL, tanto de nuestro estudio como de otros trabajos publicados, es superior al reportado en los DLBCL sistémicos, a pesar de la baja frecuencia de reordenamientos del gen. En nuestra serie, la expresión de MYC en el 30% o más de las células neoplásicas ($MYC \geq 30$) se asoció a una menor OS (OS a 2 años: 18% vs. 48% en los casos $MYC \geq 30$ y $MYC < 30$ respectivamente). La expresión de MYC no estaba relacionada con la edad, la calidad de vida (ECOG) o el resto de parámetros clínicos, inmunohistoquímicos y moleculares evaluados. Estos resultados son opuestos a los observados en el trabajo de Rubenstein *et al.*, en el que la expresión de la proteína MYC no se asoció a un peor pronóstico. Esta discrepancia podría ser debida a diferencias en la población estudiada o a la utilización de diferentes puntos de corte en la expresión de MYC. Así, en la serie de Rubenstein *et al.* todos los pacientes debían tener un $ECOG \leq 2$ como criterio de inclusión y se aplicó un punto de corte del 50% a la hora de valorar la positividad para MYC, mientras que en nuestro trabajo el 90% de los pacientes tenían un $ECOG \geq 2$, y

el punto de corte usado para la positividad de MYC fue del 30%.

En nuestra serie observamos que los casos con una coexpresión de las proteínas MYC y BCL2 ($\geq 30\%$ de las células neoplásicas) presentaban una menor OS que aquellos sin coexpresión (17% vs 41%, respectivamente). Sin embargo, esta diferencia no resultó estadísticamente significativa ($p = 0.096$).

Finalmente, la edad de los pacientes y el tipo de tratamiento recibido se correlacionaron con la OS. Los pacientes con una edad inferior a 60 años tuvieron una mayor OS que aquellos con una edad superior a 60 años. (OS a dos años: 28% vs. 50% respectivamente, $p = 0.018$), tal y como está descrito en la literatura (Corry *et al.*, 1998; Ferreri *et al.*, 2003). Respecto al tipo de tratamiento, aquellos pacientes que recibieron únicamente radioterapia o tratamiento paliativo tuvieron una menor OS que los que recibieron quimioterapia asociada o no a radioterapia (OS a dos años: 0% vs. 55% respectivamente, $p < 0.001$). El ECOG, o calidad de vida del paciente, es un factor pronóstico frecuentemente descrito en el CNS-DLBCL. En nuestra serie, observamos una mayor OS en pacientes con $ECOG < 2$ respecto a los pacientes con $ECOG \geq 2$ (OS a dos años: 67% vs 32% respectivamente), si bien esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($p = 0.114$). Cabe decir que el 90% de los pacientes evaluados en nuestro estudio tenían un $ECOG \geq 2$ (90%), lo que podría influir en esta falta de correlación.

En conclusión, el tercer trabajo de nuestra tesis indica que el CNS-DLBCL con frecuencia presenta sobreexpresión del gen MYC, y esta sobreexpresión identifica un subgrupo de linfomas con comportamiento más

agresivo. El estudio de la expresión del gen *MYC* mediante inmunohistoquímica podría ayudar a una valoración pronóstica más precisa en el CNS-DLBCL. Sin embargo, sería conveniente validar el papel pronóstico de *MYC* en el CNS-DLBCL en series más largas de pacientes, tratados de forma homogénea, y establecer un punto de corte idóneo en el porcentaje de células neoplásicas para definir un caso como positivo o negativo para este marcador.

En conclusión, en esta tesis hemos contribuido a establecer la utilidad del marcaje inmunohistoquímico frente a la proteína

MYC a la hora de valorar el inmunofenotipo de los linfomas agresivos, y su relación con la presencia de reordenamientos del gen *MYC*; hemos puesto de manifiesto la posibilidad de obtener resultados erróneos (falsos positivos y falsos negativos) así como resultados no concluyentes o de difícil evaluación, en función de la sonda de FISH utilizada para valorar el estado del gen; y finalmente hemos señalado el posible valor pronóstico de la proteína *MYC* en el CNS-DLBCL, a pesar de la baja frecuencia de reordenamientos del gen *MYC* en este tipo de linfomas.

6. Conclusiones



6. Conclusiones

1.- La expresión de niveles elevados de proteína MYC detectados mediante técnicas inmunohistoquímicas se correlaciona con la presencia de reordenamientos del gen en los linfomas agresivos. Los DLBCL con traslocación del gen *MYC* presentan un porcentaje de células MYC positivas superior a aquellos sin reordenamiento.

2.- La presencia de ganancia de copias en el gen *MYC* no se correlaciona con una mayor expresión de la proteína MYC.

3.- Los DLBCL con reordenamiento del gen *MYC* o con niveles de expresión de la proteína MYC elevados tienen características inmunofenotípicas (CD10, BCL6, BCL2 y MUM1) y de subtipo molecular (Hans) similares a los DLBCL sin alteraciones en el gen o con niveles de expresión bajos.

4.- Algunos DLBCL sin alteraciones en el gen *MYC* sobreexpresan la proteína MYC. De igual forma, algunos DLBCL con reordenamiento del gen *MYC* expresan niveles bajos de la proteína.

5.- El uso de diferentes sondas de FISH en la evaluación del estado del gen *MYC* puede dar lugar a resultados discordantes: falsos positivos, falsos negativos o resultados conflictivos/no concluyentes.

6.- Las tres sondas evaluadas (sonda de fusión de Vysis y sondas de separación de Vysis y Dako) permiten detectar los reordenamientos producidos en la región BVR1 o en posición 5' del gen *MYC*, responsables de la mayoría de las traslocaciones *MYC-IGH* clásicas del BL.

7.- Algunas traslocaciones del gen *MYC*, probablemente producidas en la región BVR2 o en posición 3' alejada al gen, pueden detectarse únicamente con sondas de separación diseñadas de forma que cubran un amplio segmento de la región 8q24, mientras que la utilización de otro tipo de sondas da lugar a falsos negativos o resultados no concluyentes. Estos reordenamientos habitualmente afectan a los genes *IGK*, *IGL* o a genes no-*IGH*, y son frecuentes en DLBCL. Por lo tanto, en los DLBCL es recomendable utilizar este tipo de sondas de separación a la hora de valorar el estado del gen *MYC*.

8.- La presencia de ganancia de copias en el gen *MYC* puede dar lugar a un patrón sospechoso de traslocación no-*IGH-MYC* con sondas de fusión *IGH-MYC* (ratio *MYC/CEP8* >2). Más de la mitad de casos con este patrón obtenido con la sonda de fusión utilizada en nuestro estudio son debidos a amplificación y no a reordenamiento del gen *MYC*.

9.- Los CNS-DLBCL son predominantemente de tipo no-CG según el algoritmo de Hans, con negatividad para CD10 y positividad para BCL6 y MUM1. La expresión de estos marcadores inmunohistoquímicos y el subtipo molecular no se correlacionan con la supervivencia global de los pacientes.

10.- Las traslocaciones de los genes *MYC* y *BCL2* son infrecuentes si no inexistentes en los CNS-DLBCL. Las traslocaciones de *BCL6* ocurren con frecuencia en estos linfomas (44% de los casos), y no correlacionan con el pronóstico de los pacientes.

11.- Los CNS-DLBCL con frecuencia expresan niveles elevados de las proteínas *MYC* y *BCL2*, no relacionados con reordenamientos génicos. La coexpresión de ambos marcadores inmunohistoquímicos tiende a asociarse a una menor supervivencia global.

12.- Los pacientes de CNS-DLBCL con una edad superior a 60 años tienen un peor pronóstico que los de menor edad. Un ECOG>2 tiende a asociarse a una menor supervivencia global.

13.- La expresión de la proteína *MYC* en más del 30% de las células neoplásicas se asocia a una menor supervivencia global en los pacientes con CNS-DLBCL. Por lo tanto, el estudio de la expresión del gen *MYC* mediante técnicas inmunohistoquímicas puede ayudar a la valoración pronóstica de estos pacientes.

7. Referencias



7. Referencias

- A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project. *N Engl J Med*, v. 329, n. 14, p. 987-94, Sep 1993.
- ADAM, P. et al. The BCL2 E17 and SP66 antibodies discriminate 2 immunophenotypically and genetically distinct subgroups of conventionally BCL2-"negative" grade 1/2 follicular lymphomas. *Hum Pathol*, v. 44, n. 9, p. 1817-26, Sep 2013.
- Alizadeh, A. A. et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*, v. 403, n. 6769, p. 503-11, Feb 3 2000.
- Aukema, S. M. et al. Biological characterization of adult MYC-translocation-positive mature B-cell lymphomas other than molecular Burkitt lymphoma. *Haematologica*, v. 99, n. 4, p. 726-35, Apr 2014.
- Barrans, S. et al. Traslocación de MYC Asociada con Mala Pronóstico en Pacientes con Linfoma de Células B Difuso Tratado en la Era de Rituximab. *Journal of Clinical Oncology*, v. 28, n. 20, p. 3360-3365, 2010.
- BELLAS, C. et al. Immunohistochemical and molecular characteristics with prognostic significance in diffuse large B-cell lymphoma. *PLoS One*, v. 9, n. 6, p. e98169, 2014.
- Bertrand, P. et al. Mapping of MYC breakpoints in 8q24 Traslocaciones involving non-immunoglobulin partners in B-cell lymphomas. *Leukemia*, v. 21, n. 3, p. 515-23, Mar 2007.
- Boonstra, R. et al. Analysis of chromosomal copy number changes and oncoprotein expression in primary central nervous system lymphomas: frequent loss of chromosome arm 6q. *Virchows Arch*, v. 443, n. 2, p. 164-9, Aug 2003.
- Braaten, K. M. et al. BCL-6 expression predicts improved survival in patients with primary central nervous system lymphoma. *Clin Cancer Res*, v. 9, n. 3, p. 1063-9, Mar 2003.
- Brunn, A. et al. Frequent triple-hit expression of MYC, BCL2, and BCL6 in primary lymphoma of the central nervous system and absence of a favorable MYC(low)BCL2 (low) subgroup may underlie the inferior prognosis as compared to systemic diffuse large B cell lymphomas. *Acta Neuropathol*, v. 126, n. 4, p. 603-5, Oct 2013.
- Busch, K. et al. Identification of two distinct MYC breakpoint clusters and their association with various IGH breakpoint regions in the t(8;14) translocations in sporadic Burkitt-lymphoma. *Leukemia*, v. 21, n. 8, p. 1739-51, Aug 2007.
- Cady, F. M. et al. Del(6)(q22) and BCL6 Traslocaciones in primary CNS lymphoma are indicators of an aggressive clinical course. *J Clin Oncol*, v. 26, n. 29, p. 4814-9, Oct 2008.
- Camilleri-Broët, S. et al. A uniform activated B-cell-like immunophenotype might explain the poor prognosis of primary central nervous system lymphomas: analysis of 83 cases. *Blood*, v. 107, n. 1, p. 190-6, Jan 2006.
- Campbell, J. et al. The prognostic impact of bone marrow involvement in patients with diffuse large cell lymphoma varies according to the degree of infiltration and presence of discordant marrow involvement. *European Journal of Haematology*, v. 76, n. 6, p. 473-480, 2006.
- Campbell, K. J.; White, R. J. MYC regulation of cell growth through control of transcription by RNA polymerases I and III. *Cold Spring Harb Perspect Med*, v. 4, n. 5, May 2014.
- Choi, W. W. et al. A new immunostain algorithm classifies diffuse large B-cell lymphoma into molecular subtypes with high accuracy. *Clin Cancer Res*, v. 15, n. 17, p. 5494-502, Sep 2009.
- Coiffier, B. et al. Long-term outcome of patients in the LNH-98.5 trial, the first randomized study comparing rituximab-CHOP to standard CHOP chemotherapy in DLBCL patients: a study by the Groupe d'Etudes des Lymphomes de l'Adulte. *Blood*, v. 116, n. 12, p. 2040-5, Sep 2010.
- Conacci-Sorrell, M.; McFerrin, L.; Eisenman, R. N. An overview of MYC and its interactome. *Cold Spring Harb Perspect Med*, v. 4, n. 1, p. a014357, Jan 2014.
- CORRY, J. Primary central nervous system lymphoma: age and performance status are more important than treatment modality. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, v. 41, n. 3, p. 615-20, Jun 1998.
- Coutinho, R. et al. Poor concordance among nine immunohistochemistry classifiers of cell-of-origin for diffuse large B-cell lymphoma: implications for therapeutic strategies. *Clin Cancer Res*, v. 19, n. 24, p. 6686-95, Dec 2013.

- Culpin, R. E. *et al.* Prognostic significance of immunohistochemistry-based markers and algorithms in immunochemotherapy-treated diffuse large B cell lymphoma patients. *Histopathology*, v. 63, n. 6, p. 788-801, Dec 2013.
- Dalla-Favera, R. *et al.* Human c-myc onc gene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 79, n. 24, p. 7824-7, Dec 1982.
- Dang, C. V. MYC on the path to cancer. *Cell*, v. 149, n. 1, p. 22-35, Mar 2012. Dave, S. S. *et al.* Molecular Diagnosis of Burkitt's Lymphoma. *New England Journal of Medicine*, v. 354, n. 23, p. 2431-2442, 2006.
- Dave, S. S. *et al.* Molecular Diagnosis of Burkitt's Lymphoma. *New England Journal of Medicine*, v. 354, n. 23, p. 2431-2442, 2006.
- Deckert, M. *et al.* Modern concepts in the biology, diagnosis, differential diagnosis and treatment of primary central nervous system lymphoma. *Leukemia*, v. 25, n. 12, p. 1797-807, Dec 2011.
- Deckert, M. *et al.* Systems biology of primary CNS lymphoma: from genetic aberrations to modeling in mice. *Acta Neuropathol*, v. 127, n. 2, p. 175-88, Feb 2014.
- Dunphy C. H.; Cagle, P. T. *Molecular Pathology of Hematolymphoid Diseases*. Springer US, 2010.
- Einerson, R. R. *et al.* Novel FISH probes designed to detect IGH-MYC and IGL-MYC Translocaciones in B-cell lineage malignancy identify a new breakpoint cluster region designated BVR2. *Leukemia*, v. 20, n. 10, p. 1790-9, Oct 2006.
- Ferreri, A. J. *et al.* Prognostic scoring system for primary CNS lymphomas: the International Extranodal Lymphoma Study Group experience. *J Clin Oncol*, v. 21, n. 2, p. 266-72, Jan 2003.
- Ferry, J. A. *Extranodal Lymphomas*. Elsevier Health Sciences, 2011.
- Fischer, L. *et al.* Differential micro-RNA expression in primary CNS and nodal diffuse large B-cell lymphomas. *Neuro Oncol*, v. 13, n. 10, p. 1090-8, Oct 2011.
- Fu, K. *et al.* Addition of rituximab to standard chemotherapy improves the survival of both the germinal center B-cell-like and non-germinal center B-cell-like subtypes of diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol*, v. 26, n. 28, p. 4587-94, Oct 2008.
- Green, T. M. *et al.* High levels of nuclear MYC protein predict the presence of MYC Translocación in diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Surg Pathol*, v. 36, n. 4, p. 612-9, Apr 2012.
- Green, T. M. *et al.* Immunohistochemical double-hit score is a strong predictor of outcome in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone. *J Clin Oncol*, v. 30, n. 28, p. 3460-7, Oct 2012.
- Hann, S. R. Role of post-translational modifications in regulating c-Myc proteolysis, transcriptional activity and biological function. *Semin Cancer Biol*, v. 16, n. 4, p. 288-302, Aug 2006.
- Hann, S. R. *et al.* A non-AUG translational initiation in c-myc exon 1 generates an N-terminally distinct protein whose synthesis is disrupted in Burkitt's lymphomas. *Cell*, v. 52, n. 2, p. 185-95, Jan 1988.
- Hans, C. P. *et al.* Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood*, v. 103, n. 1, p. 275-82, Jan 2004.
- Hattab, E. M. *et al.* Most primary central nervous system diffuse large B-cell lymphomas occurring in immunocompetent individuals belong to the non-germinal center subtype: a retrospective analysis of 31 cases. *Mod Pathol*, v. 23, n. 2, p. 235-43, Feb 2010.
- Henglein, B. *et al.* Three breakpoints of variant t(2;8) translocations in Burkitt's lymphoma cells fall within a region 140 kilobases distal from c-myc.
- Hu, S. *et al.* MYC/BCL2 protein coexpression contributes to the inferior survival of activated B-cell subtype of diffuse large B-cell lymphoma and demonstrates high-risk gene expression signatures: a report from The International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program. *Blood*, v. 121, n. 20, p. 4021-31; quiz 4250, May 2013.
- Hummel, M. *et al.* A Biologic Definition of Burkitt's Lymphoma from Transcriptional and Genomic Profiling. *New England Journal of Medicine*, v. 354, n. 23, p. 2419-2430, 2006.
- Iqbal, J. *et al.* Distinctive patterns of BCL6 molecular alterations and their functional consequences in different subgroups of diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia*, v. 21, n. 11, p. 2332-43, Nov 2007.
- Iqbal, J. *et al.* BCL2 predicts survival in germinal center B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma treated with CHOP-like therapy and rituximab. *Clin Cancer Res*, v. 17, n. 24, p. 7785-95, Dec 2011.
- Jaffe, E. S. *Hematopathology*. Saunders/Elsevier, 2011.
- Jerkeman, M. *et al.* Prognostic implications of BCL6 Translocación in uniformly treated patients with diffuse large B-cell lymphoma--a Nordic Lymphoma Group study. *Int J Oncol*, v. 20, n. 1, p. 161-5, Jan 2002.

- Johnson, N. A. *et al.* Lymphomas with concurrent BCL2 and MYC translocations: the critical factors associated with survival. *Blood*, v. 114, n. 11, p. 2273-9, Sep 2009.
- Johnson, N. A. *et al.* Concurrent expression of MYC and BCL2 in diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone. *J Clin Oncol*, v. 30, n. 28, p. 3452-9, Oct 2012.
- Joos, S. *et al.* Variable breakpoints in Burkitt lymphoma cells with chromosomal t(8;14) translocation separate c-myc and the IgH locus up to several hundred kb. *Hum Mol Genet*, v. 1, n. 8, p. 625-32, Nov 1992.
- Joos, S. *et al.* Mapping chromosomal breakpoints of Burkitt's t(8;14) translocations far upstream of c-myc. *Cancer Res*, v. 52, n. 23, p. 6547-52, Dec 1992.
- Karube, K.; Campo, E. MYC alterations in diffuse large B-cell lymphomas. *Semin Hematol*, v. 52, n. 2, p. 97-106, Apr 2015.
- Kluk, M. J. *et al.* Immunohistochemical detection of MYC-driven diffuse large B-cell lymphomas. *PLoS One*, v. 7, n. 4, p. e33813, 2012.
- Korfel, A.; Schlegel, U. Diagnosis and treatment of primary CNS lymphoma. *Nat Rev Neurol*, v. 9, n. 6, p. 317-27, Jun 2013.
- Korfel, A. *et al.* Prognostic impact of meningeal dissemination in primary CNS lymphoma (PCNSL): experience from the G-PCNSL-SG1 trial. *Ann Oncol*, v. 23, n. 9, p. 2374-80, Sep 2012.
- Lenz, G.; Staudt, L. M. Aggressive lymphomas. *N Engl J Med*, v. 362, n. 15, p. 1417-29, Apr 2010.
- Leucci, E. *et al.* MYC translocation-negative classical Burkitt lymphoma cases: an alternative pathogenic mechanism involving miRNA deregulation. *J Pathol*, v. 216, n. 4, p. 440-50, Dec 2008.
- Levy, O. *et al.* Bcl-6 predicts improved prognosis in primary central nervous system lymphoma. *Cancer*, v. 112, n. 1, p. 151-6, Jan 2008. Li, S. *et al.* MYC/BCL2 double-hit high-grade B-cell lymphoma. *Adv Anat Pathol*, v. 20, n. 5, p. 315-26, Sep 2013.
- Li, S. *et al.* MYC/BCL2 double-hit high-grade B-cell lymphoma. *Adv Anat Pathol*, v. 20, n. 5, p. 315-26, Sep 2013. Lin, C. Y. *et al.* Transcriptional amplification in tumor cells with elevated c-Myc. *Cell*, v. 151, n. 1, p. 56-67, Sep 2012. ISSN 1097-4172.
- Lin, C. Y. *et al.* Transcriptional amplification in tumor cells with elevated c-Myc. *Cell*, v. 151, n. 1, p. 56-67, Sep 2012.
- Lin, P. *et al.* Prognostic value of MYC Translocación in cases of B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between diffuse large B-cell lymphoma and Burkitt lymphoma. *Cancer*, v. 118, n. 6, p. 1566-73, Mar 2012. ISSN 1097-0142.
- Lüscher, B. MAD1 and its life as a MYC antagonist: an update. *Eur J Cell Biol*, v. 91, n. 6-7, p. 506-14, 2012 Jun-Jul 2012. ISSN 1618-1298.
- May P. C. *et al.* Detection of cryptic and variant IGH-MYC rearrangements in high-grade non-Hodgkin's lymphoma by fluorescence in situ hybridization: implications for cytogenetic testing. *Cancer Genet Cytogenet*, v. 198, n. 1, p. 71-5, Apr 2010.
- Meyer, N.; Penn, L. Z. Reflecting on 25 years with MYC. *Nat Rev Cancer*, v. 8, n. 12, p. 976-90, Dec 2008. ISSN 1474-1768.
- Meyer, P. N. *et al.* Immunohistochemical methods for predicting cell of origin and survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab. *J Clin Oncol*, v. 29, n. 2, p. 200-7, Jan 2011.
- Molyneux, E. M. *et al.* Burkitt's lymphoma. *Lancet*, v. 379, n. 9822, p. 1234-44, Mar 2012.
- Montesinos-Rongen, M. *et al.* Primary diffuse large B-cell lymphomas of the central nervous system are targeted by aberrant somatic hypermutation. *Blood*, v. 103, n. 5, p. 1869-75, Mar 2004.
- Montesinos-Rongen, M. *et al.* Interphase cytogenetic analysis of lymphoma-associated chromosomal breakpoints in primary diffuse large B-cell lymphomas of the central nervous system. *J Neuro-pathol Exp Neurol*, v. 61, n. 10, p. 926-33, Oct 2002.
- Muris, J. J. *et al.* Immunohistochemical profiling based on Bcl-2, CD10 and MUM1 expression improves risk stratification in patients with primary nodal diffuse large B cell lymphoma. *J Pathol*, v. 208, n. 5, p. 714-23, Apr 2006.
- Nagel, I. *et al.* Identification of the gene encoding cyclin E1 (CCNE1) as a novel IGH translocation partner in t(14;19)(q32;q12) in diffuse large B-cell lymphoma. *Haematologica*, v. 94, n. 7, p. 1020-3, Jul 2009.
- Nie, Z. *et al.* c-Myc is a universal amplifier of expressed genes in lymphocytes and embryonic stem cells. *Cell*, v. 151, n. 1, p. 68-79, Sep 2012.
- Niitsu, N. *et al.* Prognostic impact of chromosomal alteration of 3q27 on nodal B-cell lymphoma: Correlation with histology, immunophenotype, karyotype, and clinical outcome in 329 consecutive patients. *Leukemia Research*, v. 31, n. 9, p. 1191-1197.
- Nyman, H. *et al.* Prognostic impact of activated B-cell focused classification in diffuse large B-cell lymphoma.

- phoma patients treated with R-CHOP. *Mod Pathol*, v. 22, n. 8, p. 1094-101, Aug 2009.
- Ott, G.; Rosenwald, A.; Campo, E. Understanding MYC-driven aggressive B-cell lymphomas: pathogenesis and classification. *Blood*, v. 122, n. 24, p. 3884-91, Dec 2013.
- Pasqualucci, L. *et al.* Hypermutation of multiple proto-oncogenes in B-cell diffuse large-cell lymphomas. *Nature*, v. 412, n. 6844, p. 341-6, Jul 2001.
- Pasqualucci, L. *et al.* Analysis of the coding genome of diffuse large B-cell lymphoma. *Nat Genet*, v. 43, n. 9, p. 830-7, Sep 2011.
- Perry, A. M. *et al.* B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between diffuse large B-cell lymphoma and burkitt lymphoma: study of 39 cases. *Br J Haematol*, v. 162, n. 1, p. 40-9, Jul 2013.
- Perry, A. M., B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between diffuse large B-cell lymphoma and burkitt lymphoma: study of 39 cases. *British Journal of Haematology*, v. 162, n. 1, p. 40-49, 2013.
- Petrich, A. M.; Nabhan, C.; Smith, S. M. MYC-associated and double-hit lymphomas: A review of pathobiology, prognosis, and therapeutic approaches. *Cancer*, v. 120, n. 24, p. 3884-3895, 2014.
- Preusser, M. *et al.* Primary central nervous system lymphoma: a clinicopathological study of 75 cases. *Pathology*, v. 42, n. 6, p. 547-52, 2010.
- Richter, J. *et al.* Recurrent mutation of the ID3 gene in Burkitt lymphoma identified by integrated genome, exome and transcriptome sequencing. *Nat Genet*, v. 44, n. 12, p. 1316-20, Dec 2012. ISSN 1546-1718.
- Rosenwald, A. *et al.* The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med*, v. 346, n. 25, p. 1937-47, Jun 2002.
- Rubenstein, J. L. *et al.* Gene expression and angiotropism in primary CNS lymphoma. *Blood*, v. 107, n. 9, p. 3716-23, May 2006.
- Rubenstein, J. L., Intensive chemotherapy and immunotherapy in patients with newly diagnosed primary CNS lymphoma: CALGB 50202 (Alliance 50202). *J Clin Oncol*, v. 31, n. 25, p. 3061-8, Sep 2013
- Ruzinova, M. B.; Caron, T.; Rodig, S. J. Altered subcellular localization of c-Myc protein identifies aggressive B-cell lymphomas harboring a c-MYC translocation. *Am J Surg Pathol*, v. 34, n. 6, p. 882-91, Jun 2010.
- Sabò, A. *et al.* Selective transcriptional regulation by Myc in cellular growth control and lymphomagenesis. *Nature*, v. 511, n. 7510, p. 488-92, Jul 2014.
- Salghetti, S. E.; Kim, S. Y.; Tansey, W. P. Destruction of Myc by ubiquitin-mediated proteolysis: cancer-associated and transforming mutations stabilize Myc. *EMBO J*, v. 18, n. 3, p. 717-26, Feb 1999.
- Sarosied, K. A. *et al.* Novel IL-21 signaling pathway up-regulates c-Myc and induces apoptosis of diffuse large B-cell lymphomas. *Blood*, v. 115, n. 3, p. 570-80, Jan 2010.
- Savage, K. J. *et al.* MYC gene Translocaciones are associated with a poor prognosis in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with R-CHOP chemotherapy. 2009.
- Schmitz, R. *et al.* Burkitt lymphoma pathogenesis and therapeutic targets from structural and functional genomics. *Nature*, v. 490, n. 7418, p. 116-120, 10/04/print 2012.
- Sehn, L. H. *et al.* The revised International Prognostic Index (R-IPI) is a better predictor of outcome than the standard IPI for patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *Blood*, v. 109, n. 5, p. 1857-61, Mar 2007.
- Sehn, L. H. *et al.* Introduction of combined CHOP plus rituximab therapy dramatically improved outcome of diffuse large B-cell lymphoma in British Columbia. *J Clin Oncol*, v. 23, n. 22, p. 5027-33, Aug 2005.
- Snuderl, M. *et al.* B-cell Lymphomas with Concurrent IGH-BCL2 and MYC Translocaciones Are Aggressive Neoplasms with Clinical and Pathologic Features Distinct from Burkitt Lymphoma and Diffuse Large B-cell Lymphoma. *The American journal of surgical pathology*, v. 34, n. 3, p. 327-340, 2010. I
- Spotts, G. D. *et al.* Identification of downstream-initiated c-Myc proteins which are dominant-negative inhibitors of transactivation by full-length c-Myc proteins. *Mol Cell Biol*, v. 17, n. 3, p. 1459-68, Mar 1997.
- Stasik, C. J. *et al.* Increased MYC gene copy number correlates with increased mRNA levels in diffuse large B-cell lymphoma. *Haematologica*, v. 95, n. 4, p. 597-603, Apr 2010.
- Swerdlow, S. H. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2008.
- Tapia, G. *et al.* Immunohistochemical detection of MYC protein correlates with MYC gene *status* in aggressive B cell lymphomas. *Histopathology*, v. 59, n. 4, p. 672-8, Oct 2011.
- Thomas, L. R.; Tansey, W. P. Proteolytic control of the oncoprotein transcription factor Myc. *Adv Cancer Res*, v. 110, p. 77-106, 2011.

- Toujani, S. *et al.* High resolution genome-wide analysis of chromosomal alterations in Burkitt's lymphoma. *PLoS One*, v. 4, n. 9, p. e7089, 2009.
- Valera, A. Implicació de l'oncogen MYC en la patogènesi dels limfomes B agressius. 2013. 151 Departament d'Anatomia Patològica, Microbiologia i Farmacologia, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona, www.tdx.cat.
- Valera, A. *et al.* ALK-positive large B-cell lymphomas express a terminal B-cell differentiation program and activated STAT3 but lack MYC rearrangements. *Mod Pathol*, v. 26, n. 10, p. 1329-37, Oct 2013.
- Valera, A. *et al.* MYC protein expression and genetic alterations have prognostic impact in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with immunochemotherapy. *Haematologica*, v. 98, n. 10, p. 1554-62, Oct 2013.
- Ventura, R. A. *et al.* FISH analysis for the detection of lymphoma-associated chromosomal abnormalities in routine paraffin-embedded tissue. *J Mol Diagn*, v. 8, n. 2, p. 141-51, May 2006.
- Visco, C. *et al.* Comprehensive gene expression profiling and immunohistochemical studies support application of immunophenotypic algorithm for molecular subtype classification in diffuse large B-cell lymphoma: a report from the International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program Study. *Leukemia*, v. 26, n. 9, p. 2103-13, Sep 2012.
- Visco, C. *et al.* Patients with diffuse large B-cell lymphoma of germinal center origin with BCL2 translocations have poor outcome, irrespective of MYC status: a report from an International DLBCL rituximab-CHOP Consortium Program Study. *Haematologica*, v. 98, n. 2, p. 255-63, Feb 2013.
- Walz, S. *et al.* Activation and repression by oncogenic MYC shape tumour-specific gene expression profiles. *Nature*, v. 511, n. 7510, p. 483-7, Jul 2014.
- Weber, T. *et al.* Characteristic chromosomal imbalances in primary central nervous system lymphomas of the diffuse large B-cell type. *Brain Pathol*, v. 10, n. 1, p. 73-84, Jan 2000.
- Zhang, J. *et al.* Genetic heterogeneity of diffuse large B-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 110, n. 4, p. 1398-403, Jan 2013.
- Ziepert, M. *et al.* Standard International prognostic index remains a valid predictor of outcome for patients with aggressive CD20+ B-cell lymphoma in the rituximab era. *J Clin Oncol*, v. 28, n. 14, p. 2373-80, May 2010.

