

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

FACULTAT DE CIÈNCIES

TESI DOCTORAL

**APLICACIÓ DE LA CITOGENÈTICA CONVENCIONAL I
LA HIBRIDACIÓ IN SITU A L'ESTUDI DE SÍNDROMES
LIMFOPROLIFERATIVES CRÒNIQUES B**

**Memòria presentada per Blanca Espinet i Solà per assolir el grau de
Doctora en Ciències (Biologia) per la Universitat Autònoma de Barcelona.**

Bellaterra, gener 2001.

El Dr. Josep Egozcue Cuixart, catedràtic de Biologia Cel.lular i professor del Departament de Biologia Cel.lular i Fisiologia de la Universitat Autònoma de Barcelona i el Dr. Francesc Solé Ristol, cap de la Secció de Citogenètica del Laboratori de Citologia Hematològica, Departament de Patologia de l'Hospital del Mar de Barcelona,

CERTIFIQUEN:

Que na Blanca Espinet i Solà ha realitzat, sota la seva direcció, el treball **“Aplicació de la citogenètica convencional i la hibridació in situ a l'estudi de síndromes limfoproliferatives cròniques B”** per a optar al grau de Doctora en Ciències.

Aquest treball s'ha realitzat en el Laboratori de Citologia Hematològica de l'Hospital Central l'Aliança i de l'Hospital del Mar de Barcelona.

Bellaterra, gener 2001.

Dr. Josep Egozcue Cuixart

Dr. Francesc Solé Ristol

Blanca Espinet i Solà

Als meus pares

Glòria
Dra. Pedro
Dr. Sans-Sabrafen
David
Marta
Encarna
Lurdes
Eli
Anna
Mònica
Natàlia
Itzi
Rosa M^a
Ale
Kiko
Consol
Dra. Abella
Dr. Serrano
Mari
Maite
Lourdes
Dra. Woessner
Rosalia
Dr. Besses
Dra. Coll
Dra. Caballín
Rosa
Dr. Egozcue

***A TOTS VOSALTRES, QUE D'ALGUNA MANERA
HEU CONTRIBUÏT A QUE AQUESTA TESI
S'HAGI POGUT REALITZAR,
MOLTES GRÀCIES.***

Toni
Arnau
Francesc
Mercè
Pau i Conchita
Lena i Fernando
Dr. Sandberg
Andrea
Deshong
Sheryn
Mathilda
Angie
Aurelia

GLOSSARI D'ABREVIATURES

ADN	Àcid desoxirribonucleic
ARN	Àcid ribonucleic
ARNm	ARN missatger
Ag	Antígen
ATM	<i>Ataxia telangiectasia mutated</i>
BACs	<i>Bacterial artificial chromosomes</i> , cromosomes artificials de bacteries
BCL-1	<i>B-cell leukemia/lymphoma 1</i>
BCL-2	<i>B-cell leukemia/lymphoma 2</i>
BCL-3	<i>B-cell leukemia/lymphoma 3</i>
BCL-6	<i>B-cell leukemia/lymphoma 6</i>
BCR	<i>B-cell receptor</i> , receptor de cèl.lules B
CCND1	Ciclina D1
CDKi	<i>Cyclin dependent kinase inhibitors</i> , inhibidors de les ciclines dependents de kinases
CDKs	<i>Cyclin dependent kinases</i> , kinases dependents de ciclines
CEP	<i>Chromosomes enumeration DNA FISH probes</i> , sondes centromèriques
CFU-L	<i>Colony formation unit-lymphoid</i> , cèl.lula mare
CFU-LM	<i>Colony formation unit-lymphomyeloid</i> , cèl.lula mare limfomieloide
CFU-M	<i>Colony formation unit-lymyeloid</i> , cèl.lula mare mieloide
CZMN	Cèl.lules de la zona marginal normal
DXS	Dextran sulfat
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> , Àcid etilendiaminotetraacètic
EORTC	<i>European organization for the research and treatment of cancer</i>
FISH	<i>Fluorescence in situ hybridization</i> , hibridació in situ fluorescent
HGC	Hibridació genòmica comparada
HIS	Hibridació in situ
Ig	Immunoglobulina
IgH	Cadena pesada de les immunoglobulines
IgL	Cadena lleugera de les immunoglobulines
Igm/mlg	Immunoglobulines de membrana

IgS	Immunoglobulines de superfície
ILSG	<i>International lymphoma study group</i>
IWCCLL	International working party on chromosomes in chronic lymphocytic leukemia
LB	Limfoma de Burkitt/leucèmia de cèl.lules de Burkitt
LCF	Limfoma centrefol·licular
LCM	Limfoma de cèl.lules del mantell
LDCG	Limfoma difús de cèl.lules grans
LDH	Lactat deshidrogenasa
LELVC	Limfoma esplènic amb limfòcits vellosos circulants
LEZM	Limfoma esplènic de la zona marginal
LLC	Leucèmia limfàtica crònica
LLCa	Leucèmia limfàtica crònica atípica
LLC/LLPe	Leucèmia limfàtica crònica/limfoma de limfòcits petits
LLP	Limfoma limfoplasmocític
LMALT	Limfoma de la zona marginal extranodal B de tipus MALT
LOH	<i>Loss of heterozygosity</i> , pèrdua d'heterozigositat
LPC	Leucèmia prolimfocítica crònica
LPS	Lipopolisacàrid d' <u>Escherichia coli</u>
LSI	<i>Unique sequence DNA FISH probes</i> , sondes de locus específic
LZM	Limfomes de la zona marginal (en general)
LZMN	Limfoma de la zona marginal nodal B (\pm cèl.lules B monocitoides)
M-FISH	<i>Multicolor FISH</i>
MAB	<i>Mouse antibiotin antibody</i> , anticòs antibiotina de ratolí
MALT	<i>Mucose associated lymphoid tissue</i>
MBR	<i>Major breakpoint region</i>
mcr	<i>minor cluster region</i>
MM	Mieloma múltiple/ Plasmocitoma
MMR	malaltia mínima residual
NF2	Neurofibromatosi tipus 2
NRS	<i>Normal rabbit serum</i> , sèrum normal de conill
OMS	Organització mundial de la salut
PACs	<i>P1 artificial chromosomes</i> , cromosomes artificials de P1
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> , reacció en cadena de la polimerasa

PHA	Fitohemaglutinina
PRAD-1	<i>Parathyroid adenoma-1</i>
pRb	Producte del gen retinoblastoma
PWM	<i>Pokeweed mitogen</i>
RAMPO	<i>Rabbit antimouse peroxidase</i> , anticòs de conill antiratolí conjugat amb peroxidasa
RB1	Retinoblastoma
RDX	Radixina
REAL	<i>Revised european-american classification for lymphoid neoplasms</i>
RLFP	<i>Restriction fragment length polymorphism</i>
RxFISH	<i>Cross species color banding FISH</i>
SKY	<i>Spectral karyotyping</i>
SL	Pseudocadenes lleugeres de les immunoglobulines
SLPC	Síndromes limfoproliferatives cròniques
SSCP	<i>Single strand conformation polymorphism</i>
SWOG	<i>Southwest oncology group</i>
TCR	<i>T-cell receptor</i> , receptor de cèl.lules T
TdT	<i>Terminal deoxynucleotidyl transferase</i> , deoxinucleotidil transferasa terminal
TL	Tricoleucèmia
TPA	Acetat de miristat de tetraforbol
VCR	<i>Variable cluster region</i>
VEB	Virus d'Epstein-Barr
WHO	<i>World health organization</i>
YACS	<i>Yeast artificial chromosomes</i> , cromosomes artificials de llevat

ÍNDIX

1. INTRODUCCIÓ	1
1.1. Motivació personal pel projecte	2
1.2. Limfopoesi	3
1.2.1. Introducció a l'hematopoesi	3
1.2.2. Limfopoesi	4
1.2.2.1. Sistema Limfoide	4
1.2.2.2. Cèl.lules limfoides	7
1.2.2.2.1. Els limfòcits T	7
1.2.2.2.2. Els limfòcits B	8
1.3. Les Síndromes Limfoproliferatives Cròniques B (SLPC-B)	13
1.3.1. Introducció a les Síndromes Limfoproliferatives Cròniques (SLPC)	13
1.3.2. Classificació de les SLPC	13
1.3.3. Contribució de la citogenètica convencional i la hibridació in situ a la classificació de les SLPC-B	15
1.3.4. Diagnòstic diferencial entre algunes neoplàsies de cèl.lules B madures amb expressió perifèrica	23
1.4. Descripció de les entitats estudiades	24
1.4.1. Leucèmia limfàtica crònica B (LLC-B)	24
1.4.1.1. Introducció i epidemiologia	24
1.4.1.2. Etiologia	25
1.4.1.3. Característiques clíniques	25
1.4.1.4. Característiques ontogèniques, histològiques, morfològiques i immunològiques	26
1.4.1.5. Característiques citogenètiques i gèniques	31
1.4.1.6. Correlació entre les alteracions cromosòmiques i gèniques, la morfologia, l'immunofenotip, les característiques clíniques i el pronòstic	42

1.4.2. Limfoma de cèl.lules del mantell (LCM)	46
1.4.2.1. Introducció i epidemiologia	46
1.4.2.2. Característiques clíniques	47
1.4.2.3. Característiques ontogèniques, histològiques, morfològiques i immunològiques	48
1.4.2.4. Característiques citogenètiques	51
1.4.2.5. Característiques gèniques	54
1.4.3. Limfoma esplènic de la zona marginal (LEZM)	59
1.4.3.1. Introducció i epidemiologia	59
1.4.3.2. Característiques clíniques	61
1.4.3.3. Característiques ontogèniques, histològiques, morfològiques i immunològiques	61
1.4.3.4. Característiques citogenètiques i gèniques	65
1.5. Objectius	68
2. MATERIAL I MÈTODES	69
2.1. Pacients	70
2.2. Mètodes	70
2.2.1. Tècniques de citogenètica convencional	70
2.2.1.1. Extracció i conservació de les mostres	70
2.2.1.2. Composició del medi de cultiu	72
2.2.1.3. Tècniques de processat dels diferents teixits	72
2.2.1.3.1. Tècnica de citogenètica convencional en cultius de sang perifèrica	72
2.2.1.3.2. Tècnica de citogenètica convencional en cultius de medul.la òssia	74
2.2.1.3.3. Tècnica de citogenètica convencional en cultius de gangli limfàtic	75
2.2.1.3.4. Tècnica de citogenètica convencional en cultius de líquid pleural	77
2.2.1.4. Tècniques de bandes	78
2.2.1.5. Anàlisi microscòpica i nomenclatura de citogenètica convencional	79

2.2.2. Tècniques d'hibridació in situ	79
2.2.2.1. Tipus de mostres	79
2.2.2.2. Metodologia d'hibridació in situ (HIS)	79
2.2.2.2.1. Protocol d'HIS amb marcatge indirecte de les sondes amb biotina i detecció immunoenzimàtica amb la reacció de la peroxidasa. Sondes centromèriques i de pintat cromosòmic	80
2.2.2.2.2. Protocol d'HIS amb marcatge directe amb fluorescència. Sondes centromèriques i específiques de locus	84
2.2.2.3. Criteris de valoració de la HIS i establiment dels nivells de tall per a cada tipus de sonda	87
2.3. Reactius i solucions	89
2.3.1. Components del medi de cultiu	89
2.3.2. Tècnica de citogenètica convencional	89
2.3.3. Tècnica d'hibridació in situ	90
3. ARTICLES	93
3.1. Article 1. Cytogenetic and in situ hybridization findings in 27 patients with atypical B-cell chronic lymphocytic leukemia	94
3.2. Article 2. Dicentric dic(17;18) in a case of atypical B-cell chronic lymphocytic leukemia	98
3.3. Article 3. Translocation (11;14)(q13;q32) and preferential involvement of chromosomes 1, 2, 9, 13 and 17 in mantle cell lymphoma	103
3.4. Article 4. Frequent involvement of chromosomes 1, 3, 7 and 8 in splenic marginal zone B-cell lymphoma	111
3.5. Article 5. Isochromosome +i(3)(q10) in a new case of persistent policlonal B-cell lymphocytosis (PPBL)	116

4. DISCUSSIÓ	120
4.1. Alteracions citogenètiques en la LLC-B atípica (articles 1 i 2)	121
4.2. Alteracions citogenètiques en el LCM (article 3)	125
4.3. Alteracions citogenètiques en el LEZM (article 4)	129
4.4. Consideracions respecte la limfocitosi B policlonal persistent (LBPP) (article 5)	131
5. CONCLUSIONS	134
6. BIBLIOGRAFIA	137

1. INTRODUCCIÓ

1.1. MOTIVACIÓ PERSONAL PEL PROJECTE

El diagnòstic de determinades neoplàsies de cèl.lules B madures amb expressió leucèmica, com és el cas de les entitats estudiades en aquest treball, ha estat, en ocasions, difícil. La classificació correcta d'aquestes entitats es basa fonamentalment en l'estudi integrat de la morfologia i l'immunofenotip de les cèl.lules neoplàsiques però, en determinats casos, aquestes característiques poden ser gairebé idèntiques i portar a la confusió. Les raons per les quals l'autora ha estat motivada per a dur a terme un estudi citogenètic i per hibridació in situ d'algunes síndromes limfoproliferatives cròniques B (SLPC-B) han estat les següents:

1. L'interès especial de la Dra. Soledad Woessner i la Dra. Lourdes Florensa, citòlogues del Laboratori de Citologia Hematològica, per intentar trobar marcadors genètics que permetessin establir el diagnòstic diferencial entre determinades SLPC-B, quan les dades morfològiques i immunològiques no eren suficients.
2. L'aprenentatge de les tècniques de citogenètica convencional gràcies al Dr. Francesc Solé i de les tècniques d'hibridació in situ, en primer lloc gràcies a la Dra. Alejandra Pérez-Losada i en segon lloc, a l'estada en el Laboratori Genzyme Genetics, Scottsdale, Arizona (USA) dirigit pel Dr. Avery A. Sandberg.
3. La continuació d'un projecte d'estudi de la trisomia 12 en la leucèmia limfàtica crònica B (LLC-B) iniciat per la Dra. Alejandra Pérez-Losada.
4. L'estímul rebut del Dr. Francesc Solé per a tirar endavant un estudi sobre alteracions citogenètiques en limfomes de cèl.lules del mantell (LCM) i per a col.laborar en un estudi multicèntric sobre les alteracions citogenètiques dels limfomes esplènics de la zona marginal (LEZM).

1.2. LIMFOPOESI

1.2.1. Introducció a l'hematopoesi

L'hematopoesi és el mecanisme fisiològic que s'encarrega de produir continuadament els diferents tipus d'elements formes de la sang i que els manté dins d'uns límits de normalitat a la sang perifèrica. En l'individu adult, l'hematopoesi té lloc a la medulla òssia, ja que aquest teixit permet l'anivament, creixement i diferenciació de les cèl·lules germinals hematopoètiques.

Gràcies a les tècniques de cultiu *in vitro*, actualment se sap que en l'home existeix una cèl·lula mare pluripotent amb capacitat de proliferació, diferenciació i autorenovació, anomenada CFU-LM (*colony formation unit-lymphomyeloid*) o cèl·lula mare limfomieloide, també coneguda com a CFU-GEMMegL degut a la seva capacitat de produir colònies *in vitro* constituïdes per granulòcits, eritròcits, monòcits, osteoclastes, megacariòcits i limfòcits T i B. A partir de la CFU-LM apareixen la cèl·lula germinal limfoide (CFU-L) i la cèl·lula germinal mieloide (CFU-M o CFU-Mix). A partir de la CFU-L té lloc la formació de tota la sèrie limfoide (Figura 1).

1.2.2. Limfopoesi

1.2.2.1. Sistema limfoide

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

- Òrgans limfoides primaris: en l'adult estan constituïts per la medulla òssia i el timus. En aquests òrgans, i a partir de cèl·lules mare hematopoètiques pluripotents, s'originen els limfòcits B i T i posteriorment maduren sense necessitar la presència d'antígens.

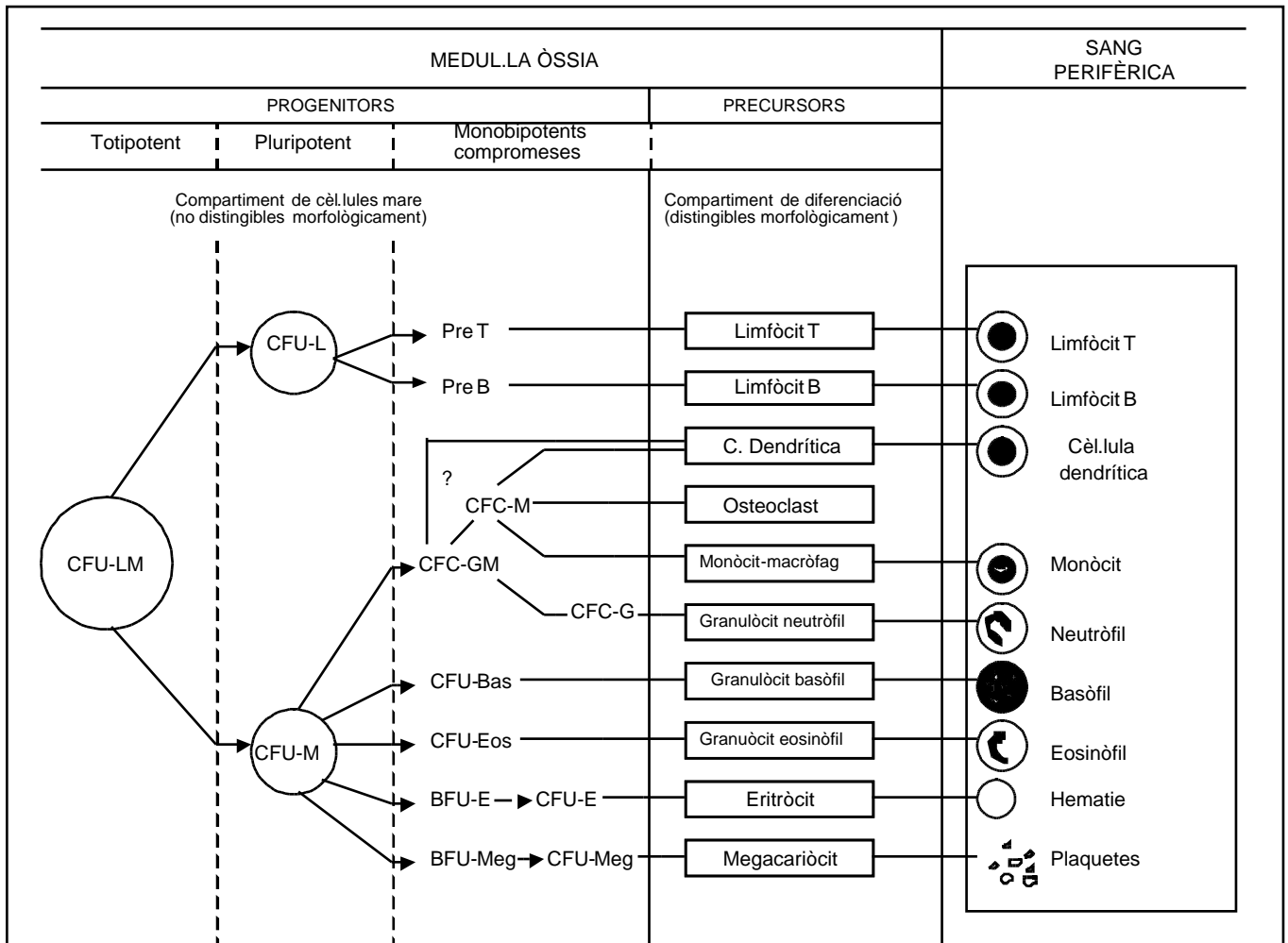


Figura 1. Esquema de l'hematopoesi humana

- Òrgans limfoides secundaris: comprenen els ganglis limfàtics, la melsa i el teixit limfoide associat als epitelis mucosos dels tractes gastrointestinal, respiratori i genitourinari (anomenat MALT, de l'anglès *mucose associated lymphoid tissue*) i de la pell. En aquests òrgans s'inicien les respostes immunitàries, de forma que els limfòcits entren en contacte amb els antígens i amb les cèl·lules accessòries del sistema limfoide o cèl·lules presentadores d'antigen. Les denominades cèl·lules presentadores d'antigen pertanyen al sistema mononuclear fagocític i reben diferents noms segons el teixit on es troben (cèl·lules de Langerhans a la pell, cèl·lules dendrítiques fol·liculars als ganglis, etc).

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

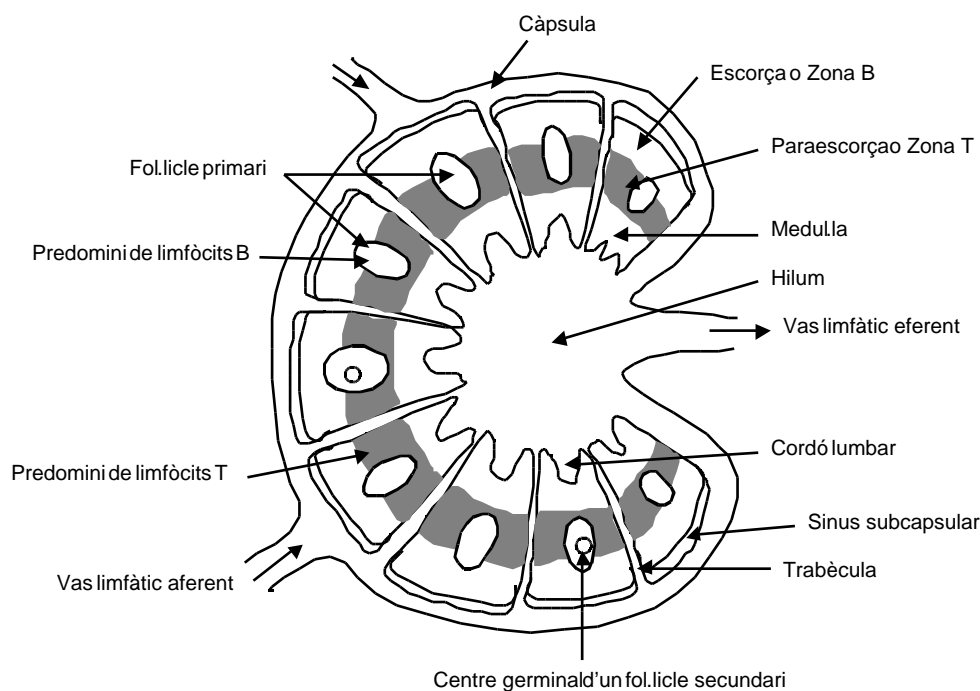


Figura 2. Esquema de l'estructura anatómica d'un gangli limfàtic

L'estructura característica del gangli limfàtic consta d'una capa externa o càpsula, una escorça o zona B, una paraescorça o zona T i una capa interna o medulla. A la zona de l'escorça se situen els fol·licles primaris, estructures arrodonides colonitzades per limfòcits B verges procedents de la medulla òssia. Quan els limfòcits del fol·licle primari reben una estimulació antigènica es constitueixen els fol·licles secundaris. En aquests casos, els limfòcits estimulats esdevenen cèl·lules blàstiques i tendeixen a disposar-se al centre del fol·licle formant el centre germinal, i al seu voltant s'observa una corona de limfòcits

petits que es denomina mantell fol·licular. Dins del centre germinal es diferencien dues zones, una zona fosca on es localitzen els centroblastes i una zona clara, en la qual es distingeixen una zona clara basal, on es troben els centròcits i una zona clara apical on es troben els blastes. Als fol·licles secundaris també s'hi troben cèl·lules dendrítiques fol·liculars, macròfags i limfòcits T. Les cèl·lules plasmàtiques i les cèl·lules plasmocitoides, també anomenades limfoplasmodiòcits, constitueixen la fase final del procés de diferenciació del blaste B del centre germinal. Els precursors de les cèl·lules plasmàtiques migren des del centre germinal cap a la medul·la òssia i es transformen en cèl·lules plasmàtiques madures. Per altra banda, la cèl·lula plasmàtica també pot originar-se al gangli a partir del centròcit o de les cèl·lules de la zona marginal. En alguns òrgans limfoides secundaris, tals com la melsa, els ganglis mesentèrics i les plaques de Peyer de l'intestí, pot trobar-se una capa de cèl·lules que envolta el mantell fol·licular anomenada zona marginal.

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

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

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

El funcionament normal del gangli limfàtic és el següent: els limfòcits procedents del corrent sanguini entren al gangli limfàtic pels vasos limfàtics aferents, que penetren a través de la càpsula i desemboquen en el sinus subcapsular marginal. Des d'aquest punt, travessen l'endoteli de les vènules postcapil·lars (també anomenades venes de l'endoteli de cèl·lules altes),

fenomen que fa que la limfa hi circuli més lentament i es faciliti la fagocitosi i els processos relacionats amb la formació d'anticossos.

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

1.2.2.2. Cèl·lules limfoides

Clàssicament, s'havien descrit dos tipus limfocitaris, els limfòcits T, encarregats de la immunitat cel·lular i els limfòcits B, responsables de la immunitat humoral. Cada un d'aquests grups estava format per diverses subpoblacions que podien ser diferenciades segons les seves característiques immunològiques, enzimàtiques, morfològiques i funcionals. En una segona etapa ha estat descrit un nou tipus de limfòcit: les cèl·lules NK o *Natural Killer*.

1.2.2.2.1. Els limfòcits T

Els limfòcits T procedeixen de la cèl·lula germinal limfoide (CFU-L) que es troba a la medulla òssia. Els precursors dels limfòcits T viatgen des de la medulla fins el timus. El timus és un òrgan limfoide primari de mida petita, situat a la part alta anterior del mediastí, que és actiu sobretot durant el període fetal i els primers anys de vida, però que en l'adult tendeix a involucionar. En aquest òrgan, els limfòcits T (timòcits), sota la influència del microambient epitelial, maduraran i esdevindran immunocompetents. Posteriorment, aquestes cèl·lules passaran a la sang perifèrica i als òrgans limfoides secundaris on es convertiran en limfòcits T madurs amb l'expressió a membrana dels receptors de limfòcits T (TCR, *T-cell receptor*). No ens estendrem en aquest tema ja que l'objecte d'estudi d'aquest treball són els limfòcits B i la seva patogènia associada en forma de síndromes limfoproliferatives, no pas els limfòcits T.

1.2.2.2.2. Els limfòcits B

Els limfòcits B procedeixen de la mateixa cèl.lula germinal que els limfòcits T, esdevenen competents immunològicament a la medul.la òssia, el fetge fetal i possiblement la placenta, i actuen com a equivalents de la bursa de Fabricius de les aus. El desenvolupament de la CFU-L per donar origen als diversos tipus de limfòcits B es produeix sota la influència d'una sèrie de contactes adhesius amb les cèl.lules de l'estroma cel.lular i de diverses citoquines i quimioquines produïdes per aquestes últimes. Aquest és un procés totalment independent dels estímuls exògens i està presidit pel reordenament dels gens de les immunoglobulines i l'expressió de les immunoglobulines a la membrana cel.lular per a formar el receptor de cèl.lules B (BCR, *B-cell receptor*) que permetrà el reconeixement de l'antígen. Cal recordar que les immunoglobulines (Ig) tenen una unitat bàsica constituïda per dues cadenes pesades (que poden ser de cinc tipus diferents: γ , μ , α , δ , ϵ) i dues cadenes lleugeres (que poden ser de dos tipus diferents: κ , λ).

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

- El precursor més immadur del limfòcit B es denomina **limfòcit pro-B (o pre-pre-B, o pre-B I)** i és identificable fenotípicament mitjançant anticossos monoclonals. Aquesta cèl.lula expressa CD34, HLA-DR, CD10 (CALLA), CD19, CD24 i l'enzim TdT. A mida que el progenitor limfoide comú progressa cap el llinatge B, s'inicia el reordenament dels gens de les Ig, que comença pels de les cadenes pesades (H, de *heavy*), mapats al cromosoma 14, amb la recombinació dels segments D-J (cèl.lula pro-B inicial) i segueix amb la recombinació del segment V amb el complex D-J recombinat (cèl.lula pro-B tardana). Aquest estadi presenta reordenament, doncs, de la cadena H de la IgM, anomenada cadena μ , que representa la primera indicació de compromís amb la línia B, però encara no s'expressen immunoglobulines de superfície.
- El següent precursor en la línia de maduració és el **limfòcit pre-B (o pre-B II)**. Es passa a aquest estadi quan un segment recombinat V-D-J és productiu i dóna lloc a la síntesi de cadenes μ , que es localitzen principalment a citoplasma, i en una petita part, a membrana, unides a pseudocadenes

lleugeres (SL), formant el que s'anomena IgM subrogada de membrana o pre-BCR. Encara no s'expressen cadenes lleugeres ni immunoglobulines de superfície. En aquest estadi encara hi ha expressió de TdT i CD10 i a més s'expressen els antígens HLA-DR, CD19 i CD24. Apareix l'expressió de CD20 i de la molècula específica de llinatge, el CD22. En aquesta fase s'expressa l'antigen leucocitari comú, el CD45. La cèl.lula precursora B també expressa CD79a, molècula que associada a CD79b i a les IgS dona lloc al BCR, i està implicada en la transducció de senyals.

- A mida que la maduració va avançant, es perd el CD10 (que es tornarà a expressar quan el limfòcit sigui estimulat per un antígen). Posteriorment es reordenen els gens de les cadenes lleugeres (L, de *light*): en una primera etapa es reordenen els gens V-J del locus kappa (mapats al cromosoma 2), i, si cap dels productes obtinguts és productiu, es reordenen els del locus lambda (mapats al cromosoma 22). Quan un reordenament és productiu (sigui kappa o lambda) se sintetitzen les cadenes lleugeres, que s'uneixen amb les cadenes μ i la cèl.lula passa a expressar IgM a la membrana. Així s'arriba a l'estadi de **limfòcit B immadur**. En aquesta cèl.lula, el contacte IgM-Antígen (Ag) dona lloc a una sèrie de processos que s'encarreguen d'eliminar per apoptosi (deleció clonal) o inactivació funcional (anèrgia clonal), o modificar (canviant l'especificitat de la IgM per un procés anomenat "revisió del receptor") aquells limfòcits que hagin generat una IgM amb autoreactivitat, és a dir, amb capacitat de reconèixer substàncies pròpies com a estranyes. Els limfòcits B immadurs que superen aquesta purga, migren cap a la perifèria per a completar la seva maduració i esdevenir limfòcits B madurs verges.

- Els **limfòcits B madurs verges** (també anomenats *naïf*, que no ha entrat en contacte amb l'Ag pel que són específiques les Ig que expressen) passen a expressar també IgD a membrana. Així, les IgM i IgD de membrana d'un d'aquests limfòcits tenen les mateixes regions VH i VL, és a dir, la mateixa especificitat per Ag, així com les mateixes cadenes L (sigui kappa o lambda). Aquest tipus cel.lular continua expressant CD19 i CD24, així com CD20 i CD22. També passa a expressar CD21, molècula que reconeix un epítot del receptor del complement CR2, que constitueix el receptor per al virus d'Epstein-Barr.

Els limfòcits B madurs verges (mIgM+, mIgD+) passen de la medul·la a la sang perifèrica (constitueixen la minoria de la població limfocitària circulant, entre un 5 i un 15%) i es dirigeixen als òrgans limfoides secundaris on se situen les zones immunològicament B dependents.

Una part dels limfòcits B circulants (10-35%) de l'adult es caracteritzen per expressar la molècula CD5, antígen de diferenciació propi de les cèl·lules T. Aquests limfòcits són els primers que apareixen en l'ontogènia dels limfòcits B i durant la vida fetal predominen per sobre dels limfòcits CD5-, així com en la infància fins als 7 anys. En l'adult se situen en els òrgans limfoides primaris i secundaris, en el mantell fol·licular, al marge del centre fol·licular. Cal esmentar que la leucèmia limfàtica crònica B (LLC-B) correspon a una expansió monoclonal de limfòcits CD5+.

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

propi fol·licle. Les cèl·lules plasmàtiques secretores d'immunoglobulines representen l'estadi final de transformació antigènica del limfòcit petit B verge, i tenen com a característica la detecció d'Ig en el seu citoplasma.

El limfòcit B reconeix l'antígen quan entra al centre germinal mitjançant l'anticòs que té unit a la membrana cel·lular. Durant aquest procés, el seu ADN genòmic està sotmès a hipermutacions. El procés d'hipermutació somàtica és un procés fisiològic que es produeix en el centre germinal del gangli limfàtic, quan el limfòcit entra en contacte amb l'antígen. Durant aquest procés, l'ADN genòmic del limfòcit està sotmès a una sèrie de canvis de nucleòtids, que poden determinar canvis en els aminoàcids que codifiquen, per tant, canvis en l'afinitat i especificitat de l'anticòs per l'antígen, que pot augmentar, disminuir o desaparèixer. Els limfòcits amb hipermutacions somàtiques que augmenten la seva afinitat per l'antígen són seleccionats i sobreviuen, mentre que els limfòcits als quals les hipermutacions somàtiques fan disminuir o perdre afinitat per l'antígen, entren en apoptosi i moren (Küppers i col., 1999).

Alguns limfòcits B que surten del fol·licle tornen a l'estat quiescent del limfòcit B petit amb memòria immunològica i poden sobreviure mesos o anys. Aquestes cèl·lules presenten característiques morfològiques i immunofenotípiques indistingibles del limfòcit B madur, tot i que a la membrana ja no expressen IgD sinó IgG, IgM i IgG o IgA, i tenen activitat ATPasa i 5'-nucleotidasa. Aquests limfòcits passen a integrar-se al reservori de limfòcits B recirculants del mantell o corona, i en la resposta secundària a anticossos seran els precursors de les cèl·lules secretores d'anticossos. Alguns limfòcits B madurs que no han estat activats per antígens, se situen a les zones T del gangli i allà, després de rebre un estímul antigènic, esdevenen immunoblastes, cèl·lules que poden seguir el procés d'estimulació fins a cèl·lula plasmàtica (Figura 3) (Fanboin i Satz, 1994; Roitt i col., 1997; Harris, 1999; Gallart i col., 2000).

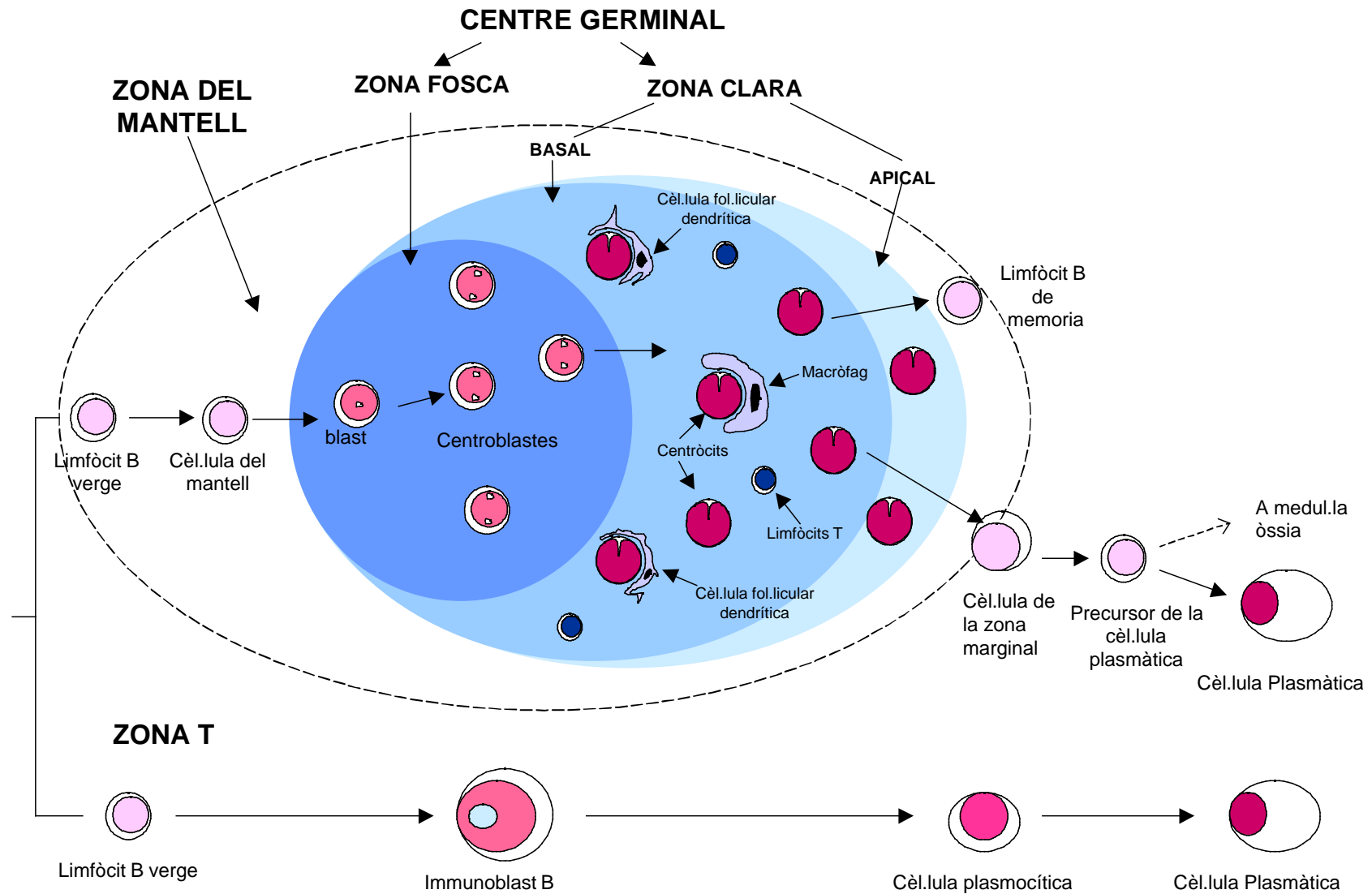


Figura 3. Representació esquemàtica del fol.licle limfoide secundari. Organització i tipus cel.lulars.

1.3. LES SÍNDROMES LIMFOPROLIFERATIVES CRÒNIQUES B (SLPC-B)

1.3.1. Introducció a les síndromes limfoproliferatives cròniques (SLPC)

Les síndromes limfoproliferatives cròniques (SLPC), també anomenades neoplàsies de cèl.lules B madures, són un grup molt divers de malalties que tenen en comú la proliferació neoplàsica i l'acumulació de cèl.lules limfàtiques o de l'estirp limfoide, ja siguin T o B, de tipus madur, en determinats teixits. Dins d'aquest grup heterogeni de malalties se separen bàsicament dos grups:

- Els "**limfomes**", actualment anomenats neoplàsies de cèl.lules B madures de tipus predominantment nodal o extranodal, que són tumors localitzats causats per una proliferació neoplàsica de cèl.lules limfoides. En la majoria de casos, aquests tumors apareixen en els nòduls limfàtics ("limfomes nodals"), però ocasionalment també poden desenvolupar-se en altres òrgans on les cèl.lules limfàtiques siguin abundants com la melsa, la medul.la òssia, el fetge, la pell i el tracte intestinal ("limfomes extranodals"). Respecte les freqüències, el 85% de tots els limfomes de l'adult són de cèl.lules B i el 15% restant, de cèl.lules T.
- Quan els limfomes s'expressen a sang perifèrica s'anomenen "**leucèmies cròniques**", també denominades com a neoplàsies de cèl.lules B madures amb expressió predominantment disseminada/leucèmica. Aquest grup engloba malalties neoplàsiques diverses que tenen en comú la proliferació i acumulació a medul.la òssia i a sang perifèrica de cèl.lules madures de l'estirp limfoide. Dins d'aquestes, un 90% són de tipus B i un 10% són de tipus T.

1.3.2. Classificació de les SLPC

La controvèrsia existent en la classificació de les SLPC s'inicia amb les primeres temptatives d'establir grups separats dins aquest tipus de patologies. Aquesta controvèrsia provenia de l'assumpció que existia un únic principi per a la classificació. Així, la majoria de les primeres classificacions que van existir es basaren purament en la morfologia (Classificacions de Gall i Mallory, 1942 i de Rappaport, 1966), d'altres varen utilitzar les característiques clíniques de les malalties com a fil conductor (*Working Formulation*, Rosenberg i col., 1982) i un

tercer grup va basar les classificacions en el llinatge cel.lular i la diferenciació, ja que creien que cada neoplàsia corresponia a l'alteració d'un tipus cel.lular normal o d'un estadi de diferenciació (Classificació de Lukes i Collins, 1974 i Classificació de Kiel, Lennert i col., 1975). Des de la dècada dels 70 fins la dècada dels 90 es varen utilitzar classificacions diverses en diferents llocs del món per a separar les mateixes patologies (essencialment la classificació de Kiel a Europa i la *Working Formulation* a Estats Units). Aquesta pràctica va dur a una manca de consens en la classificació de les SLPC i va causar una sèrie de problemes derivats de la terminologia divergent, tant als clínics com als hematòlegs i patòlegs, a l'hora d'interpretar resultats publicats. D'altra banda, cap a finals dels 80 i principis del 90 es varen descriure força entitats noves que no estaven incloses a cap classificació, fet que va causar una confusió a l'hora de decidir quines de les entitats que es veien eren "malalties reals" i quines no. La disposició de col.leccions àmplies d'anticossos monoclonals per a l'estudi immunofenotípic i l'aparició de noves tecnologies com la citogenètica i la biologia molecular, que aportaven una informació addicional no recollida en les anteriors classificacions, van conduir a una revisió de tot el sistema. Es va crear l'*International Lymphoma Study Group* (ILSG), format per 19 hematòlegs-patòlegs procedents d'Europa, d'Àsia i d'EEUU, que varen intentar crear una nova classificació que tingués en compte tota la informació de la qual es disposava –morfologia, immunofenotip, característiques genètiques i característiques clíniques-. Es va arribar a la conclusió que la importància de cada una de les característiques varia per a cada una de les patologies, però no existeix un "únic principi" classificatori. El resultat del consens de l'ILSG va dur a l'aparició d'una nova classificació, la classificació REAL (*Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms*, Harris i col., 1994). Aquesta va resultar ser molt útil per definir, a la pràctica, les diverses entitats, però també va presentar alguns defectes. Des de 1995, els membres de les societats europea i americana d'hemopatologia han estat col.laborant en l'elaboració d'una nova classificació, la classificació de l'Organització Mundial de la Salut (OMS) (WHO, *World Health Organization Classification for Hematologic Malignancies*). Aquesta classificació (Harris i col., 1999) és una revisió actual de la classificació REAL pels limfomes i s'ha estès també en la classificació de les neoplàsies mieloides i histiocitàries.

Tant la classificació REAL com la Classificació de l'OMS diferencien tres categories principals dins de les neoplàsies del sistema limfoide: neoplàsies de cèl.lules B, neoplàsies de cèl.lules T/NK i malaltia de Hodgkin/limfoma de Hodgkin. Tant les leucèmies limfoides com els limfomes s'inclouen en aquests grups, ja que s'entén que en la majoria de neoplàsies limfoides existeixen tant la fase sòlida (atribuïble al que coneixem com "limfoma") com la fase circulant (atribuïble al que s'anomena "leucèmia"). Dins de les neoplàsies de cèl.lules B i T/NK es diferencien dos subgrups principals, les neoplàsies de precursors, que correspondrien a l'afectació dels primers estadis de diferenciació, i les neoplàsies perifèriques o de cèl.lules madures, corresponents a l'afectació de limfòcits en estadis més diferenciats. La classificació de l'OMS ha inclòs una sèrie de canvis en la nomenclatura, ha separat categories heterogènies i ha adoptat algunes entitats, encara provisionals en la classificació REAL, com a definitives. D'altra banda, les neoplàsies de cèl.lules madures B i T s'agrupen d'acord amb la seva presentació clínica principal, ja sigui predominantment disseminada/leucèmica, extranodal primària o predominantment nodal.

El treball que es presenta es basa en l'estudi de síndromes limfoproliferatives cròniques B. Així doncs, a partir d'aquest moment es farà referència a aquest tipus de patologia, deixant a part les SLPC-T.

La classificació definitiva segons l'OMS de les neoplàsies limfoides B es mostra a la taula 1. A les taules 2 i 3 s'expressen les variants i graus de malignitat d'algunes de les neoplàsies de cèl.lules B madures.

1.3.3. Contribució de la citogenètica convencional i la hibridació *in situ* a la classificació de les SLPC-B

En un 50% de les neoplàsies de cèl.lules B madures amb expressió predominantment perifèrica es detecten anomalies cromosòmiques mitjançant les tècniques citogenètiques convencionals. Aquestes mostren alteracions cromosòmiques característiques. Les neoplàsies de cèl.lules B madures amb expressió predominantment nodal o extranodal, també anomenades col.loquialment "limfomes", presenten alteracions citogenètiques en un 80-90% dels casos. Les alteracions cromosòmiques més freqüents a les SLPC-B es

detallen a la taula 4 (Juliusson i Gahrton, 1990; Sandberg, 1990; Heim i Mitelman, 1995; Donner, 1997).

Taula 1. Les neoplàsies limfoides B segons la classificació de l'OMS (Harris i col., 1999)

Neoplàsies de cèl.lules B

Neoplàsies de cèl.lules B precursors

Leucèmia Limfoblàstica de Precursors B /Limfoma (Leucèmia Aguda Limfoblàstica de Precursors B)

Neoplàsies de cèl.lules B madures (perifèriques)

Leucèmia Limfàtica Crònica/Limfoma de Limfòcits Petits

Leucèmia Prolimfocítica Crònica

Limfoma Limfoplasmocític

Limfoma Esplènic de la Zona Marginal B (\pm limfòcits vellosos)

Tricoleucèmia

Mieloma Múltiple/ Plasmocitoma

Limfoma de la Zona Marginal Extranodal B de tipus MALT*

Limfoma de la Zona Marginal Nodal B (\pm cèl.lules B monocitoides)

Limfoma Centrefol.licular

Limfoma de Cèl.lules del Mantell

Limfoma Difús de Cèl.lules Grans B

Limfoma de Cèl.lules Grans B Mediastínic

Limfoma primari d'efusions

Limfoma de Burkitt/Leucèmia de cèl.lules de Burkitt

*MALT, *mucose associated lymphoid tissue* o teixit limfoide associat a mucoses.

Taula 2. Neoplàsies de cèl.lules B madures (perifèriques). Variants que contempla la classificació de l'OMS per als tipus predominantment disseminats/leucèmics

Leucèmia Limfàtica Crònica/Limfoma Limfocític de cèl.lules petites

Variant: amb gammapatia monoclonal/diferenciació plasmocítica

Tricoleucèmia

Variant: Tricoleucèmia variant

Taula 3. Limfoma Centrefol.licular i Limfoma de Cèl.lules del Mantell: graus i variants

Limfoma Centrefol.licular

Graus

Grau 1: 0-5 centroblastes/camp de gran augment

Grau 2: 6-15 centroblastes/ camp de gran augment

Grau 3: >15 centroblastes/ camp de gran augment

3a: >15 centroblastes amb centròcits encara presents

3b: centroblastes sense centròcits residuals

Variants

Limfoma Centrefol.licular cutani

Limfoma Centrefol.licular difús

Grau 1: 0-5 centroblastes/ camp de gran augment

Grau 2: 6-15 centroblastes/ camp de gran augment

Limfoma de Cèl.lules del Mantell

Variant: Blàstica

Taula 4. Alteracions cromosòmiques més freqüents a les SLPC-B

Entitat	Alteracions citogenètiques associades	Incidència
LLC/LLPe	del(13)(q14) del(11)(q22.3-q23.1) +12 del(6)(q21-q23) del(17)(p13)	53% 19% 7-25% 9% 9-15%
LPC	t(11;14)(q13;q32) t(14;17)(q32;q11) del(3)(p13) +12 t/del(12)	50%
LLP	t(9;14)(p13;q32)	50%
LEZM	del(7)(q22-q32) +3/+3q	40% 30%
TL	14q+ -Y del(5q)	-
MM	+3, +7, +11, +18 -13/del(13q)	80-90%
LMALT	t(1;14)(p21;q32) t(11;18)(q21;q21) +3/+3q	30-50% 30-70%
LZMN	+3/+3q	30-70%
LCF	t(14;18)(q32;q21) t(2;18)(p11;q21) t(18;22)(q21;q11)	85-90%
LCM	t(11;14)(q13;q32)	50-90%
LDCG	t(14;18)(q32;q21) t(2;18)(p11;q21) t(18;22)(q21;q11) t(3;V)(q27;V) t(8;14)(q24;q32) t(2;8)(p11;q24) t(8;22)(q24;q11)	12-30% 6-30% 7-10%
LB	t(8;14)(q24;q32) t(2;8)(p11;q24) t(8;22)(q24;q11)	80% 15% 5%

Abreviatures: LLC/LLPe: Leucèmia Limfàtica Crònica/Limfoma de Limfòcits Petits; LPC: Leucèmia Prolimfocítica Crònica; LLP: Limfoma Limfoplasmocític; LEZM: Limfoma Esplènic de la Zona Marginal B (± limfòcits vellosos); TL: Tricoleucèmia; MM: Mieloma múltiple/Plasmocitoma; LMALT: Limfoma de la Zona Marginal Extranodal B de tipus MALT; LZMN: Limfoma de la Zona Marginal Nodal B (±cèl.lules B monocitoides); LCF: Limfoma Centrefol·licular; LCM: Limfoma de Cèl.lules del Mantell; LDCG: Limfoma Difús de Cèl.lules Grans; LB: Limfoma de Burkitt/Leucèmia de cèl.lules de Burkitt

L'estudi citogenètic de les SLPC-B és important principalment per dues raons:

- L'anàlisi de les alteracions en el cariotip permet confirmar o orientar el diagnòstic i el pronòstic.
- L'estudi citogenètic del pacient realitzat periòdicament permet fer un seguiment de la malaltia mínima residual (MMR), en cas que en el moment del diagnòstic s'hagi trobat un marcador citogenètic.

Tot i això, l'anàlisi citogenètica de les SLPC-B ha estat limitada per diversos problemes:

- L'estudi citogenètic només es pot realitzar en cèl.lules en metafase i en general, les cèl.lules leucèmiques tenen molt poca activitat mitòtica espontània.
- La resposta cel.lular als mitògens és molt baixa i sovint variable. El mitogen més emprat en un principi va ser la fitohemaglutinina (PHA), producte químic que estimulava preferentment la divisió dels limfòcits T. Això feia molt difícil l'anàlisi de la cèl.lula neoplàsica de l'estirp B, ja que aquesta no es dividia. Sovint es trobaven metafases normals que generalment corresponien a limfòcits T i per tant l'estudi no es podia considerar informatiu. Es varen provar diferents tipus de mitògens i finalment sembla que se n'ha trobat un força més específic pels limfòcits B, l'acetat de miristat de tetraforbol (TPA). Tot i això, el problema només s'ha resolt parcialment i es continuen trobant cultius amb metafases normals o bé d'altres que, tot i haver estat estimulats amb TPA, no presenten cèl.lules en metafase.
- De vegades el problema no és l'obtenció de metafases sinó la mala qualitat d'aquestes. Això dificulta el diagnòstic citogenètic (Sandberg, 1990).

Per intentar solucionar els problemes que pot presentar l'anàlisi citogenètica de les SLPC-B a l'hora de confirmar la presència d'una determinada alteració, s'han desenvolupat altres mètodes complementaris. Un dels més importants és la tècnica d'hibridació *in situ* (HIS).

La tècnica de HIS permet la detecció i localització de seqüències específiques d'ADN sobre cromosomes metafàsics o nuclis interfàsics usant sondes específiques marcades radioactivament (Pardue i Gall, 1969) o amb substàncies no radioactives. La modificació de la tècnica que fa servir sondes no radioactives i permet detectar la hibridació observant-la en un microscopi de

fluorescència s'ha anomenat hibridació *in situ* fluorescent o FISH¹, de l'anglès *fluorescence in situ hybridization* (Pinkel i col., 1986; Anastasi i col., 1991; Price, 1993). Una de les principals aplicacions de la HIS com a tècnica complementària a la citogenètica convencional és el fet que les sondes reconeixen la seva regió homòloga no només en cromosomes metafàsics sinó també en nuclis interfàsics (Cremer i col., 1986; Hopman i col., 1988; Pérez-Losada i col., 1991; Lalkin i col., 1993; Que i col., 1993). Aquest fet ha donat lloc a l'anomenada "citogenètica interfàsica", aplicable en aquells casos on la proliferació de cèl.lules neoplàsiques és baixa i, per tant, és difícil l'obtenció de metafases, com en el cas de la leucèmia limfàtica crònica.

A principis dels anys 90 es varen començar a introduir les tècniques d'HIS en el laboratori d'hematologia, aplicades al diagnòstic, pronòstic i seguiment de les neoplàsies hematològiques en general. En el cas de les SLPC-B, la tècnica permet detectar determinades alteracions cromosòmiques no observables fàcilment per citogenètica clàssica. Els tipus de sondes que en un primer moment es varen utilitzar de forma més generalitzada varen ser les sondes centromèriques, les sondes de pintat cromosòmic i les específiques de locus. Per a distingir-les de les noves tècniques d'HIS, ens referim a aquestes com a sondes d'HIS "convencionals".

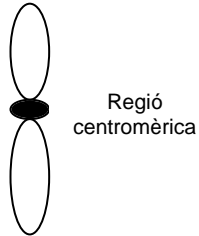
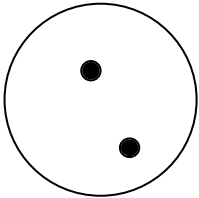
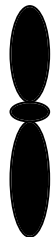


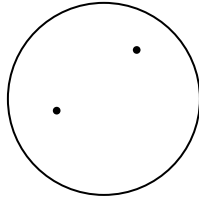
Segons el tipus d'alteració cromosòmica que vulguem identificar serà més adequat utilitzar un o altre tipus de sonda (veure figura 4):

- les sondes centromèriques estan formades per seqüències repetitives d'ADN que hibriden amb l'ADN de la regió centromèrica del cromosoma. Aquestes sondes permeten detectar alteracions cromosòmiques numèriques tant sobre metafases com sobre nuclis en interfase (citogenètica interfàsica). L'ús d'aquest tipus de sondes permet valorar la presència o absència d'alteracions numèriques (principalment monosomies i trisomies) sense necessitat de disposar de cèl.lules en divisió (per exemple, en la LLC-B s'utilitza la sonda centromèrica del cromosoma 12 per a detectar la trisomia 12).

¹ Sovint es parla de HIS i de FISH com a sinònims, tot i que estrictament no tenen el mateix sentit. HIS és un terme més general i FISH es reserva només per a la hibridació *in situ* fluorescent.

- les sondes de pintat cromosòmic estan formades per una bateria de sondes de seqüència única marcades amb el mateix color, que conjuntament hibriden amb la totalitat d'un cromosoma. Aquest tipus de sondes permeten visualitzar tant alteracions numèriques com estructurals sobre metafases, però no es poden utilitzar sobre nuclis en interfase. Són molt útils per a desxifrar cariotips amb alteracions estructurals complexes o amb cromosomes marcadors.
- les sondes específiques de locus, també anomenades de seqüència única, són seqüències d'ADN homòlogues a una regió genòmica corresponent a una banda cromosòmica o a un gen específic. Aquest tipus de sonda permet detectar alteracions numèriques i estructurals (inversions, delecions, translocacions...) tant en metafase com en interfase. Són molt útils quan es vol estudiar una regió molt concreta del genoma.

Figura 4. Tipus de sondes utilitzades en HIS "convencional. Visualització en metafase i en interfase.

	Metafase	Interfase
Sondes centromèriques		
Sondes de pintat cromosòmic		
Sondes específiques de locus o de seqüència única		

En els darrers anys, han sorgit tota una sèrie de noves tecnologies d'HIS amb la intenció d'intentar resoldre algunes de les carències de les sondes "convencionals" i aportar més informació sobre el cariotip. Aquestes metodologies comprenen essencialment les tècniques d'Hibridació Genòmica Comparada (HGC) (Kallioniemi i col., 1992), de Multicolor-FISH (M-FISH) i *Spectral Karyotyping* (SKY) (Schröck i col., 1996) i de Multibanding-FISH o *Cross-species color banding* FISH (RxFISH) (Müller i col., 1997a).

- La tècnica d'hibridació genòmica comparada (HGC), també anomenada CGH (de l'anglès, *comparative genomic hybridization*), és una tècnica citogenètica-molecular que permet detectar alteracions numèriques de seqüències d'ADN concretes (pèrdues, delecions, guanys i amplificacions) en un teixit tumoral. Aquesta tècnica es fonamenta en la hibridació *in situ* d'un ADN tumoral i d'un ADN control marcats amb fluorocroms de colors diferents sobre metafases normals. Una vegada realitzada la hibridació, les variacions numèriques en l'ADN tumoral es quantifiquen mitjançant el coeficient d'intensitat de fluorescència entre l'ADN tumoral i l'ADN normal. La HGC té utilitat en l'anàlisi de canvis numèrics de seqüències d'ADN en tumors sòlids i en aquelles neoplàsies hematològiques amb un índex de proliferació baix, ja que per a realitzar l'esmentada tècnica no cal tenir cèl.lules en divisió, sinó només el seu ADN. Així, aquesta tècnica és molt útil en aquells casos que presenten cariotips complexes amb cromosomes marcadors, doble disminuïts i regions de tinció homogènia. Val a dir que només es detecten canvis presents en una proporció alta de cèl.lules tumorals (mínim 50%), i que aquesta tècnica no permet detectar alteracions de tipus equilibrat que no comportin guanys o pèrdues de material genètic (translocacions equilibrades, inversions, etc.) (Houldsworth i Chaganti, 1994; Kallioniemi i col., 1994; Parente i col., 1997; Bentz i col., 1998).
- Les tècniques de M-FISH o SKY es basen en la cohibridació de 24 sondes de pintat cromosòmic marcades amb una combinació de cinc fluorocroms diferents sobre metafases. El resultat de la hibridació permet visualitzar simultàniament cada parella de cromosomes "pintats" d'un color diferent. Aquestes tècniques són molt útils per a desxifrar cariotips complexes i cromosomes no identificables per tècniques de citogenètica convencional

(cromosomes marcadors). La limitació d'aquestes tècniques es deu al fet de necessitar cèl.lules en divisió; per tant, no podran aplicar-se en patologies amb un índex proliferatiu baix. D'altra banda, la resolució de les tècniques de M-FISH i SKY no permet detectar alteracions que afectin regions més petites de 500-1500 Kb, per a les quals caldrà utilitzar sondes específiques de locus (Veldman i col., 1997).

- Les tècniques de multibanding-FISH, entre elles la de cross-species color banding FISH (RxFISH), representen una variació de les tècniques de pintat cromosòmic, ja que permeten la generació d'un patró de bandes de diferents colors per a cada parella de cromosomes (Müller i col., 1997a). La tècnica de RxFISH es basa en les homologies genòmiques que existeixen entre l'espècie humana i diverses espècies de gibó. Respecte de les tècniques de M-FISH o SKY, la de RxFISH permet la identificació d'alteracions estructurals en un mateix cromosoma o parell cromosòmic (inversions, translocacions, etc.), però té la limitació de necessitar cèl.lules en divisió (Wienberg i Stanyon, 1995; Müller i col., 1997b).

Cal esmentar que en el moment d'iniciar el treball experimental d'aquesta tesi (any 1995), les noves tecnologies d'HIS no havien estat incorporades als laboratoris d'hematologia, per tant, no s'han utilitzat, tot i que se'n faci referència a la introducció.

1.3.4. Diagnòstic diferencial entre algunes neoplàsies de cèl.lules B madures amb expressió perifèrica

El diagnòstic de les neoplàsies de cèl.lules B madures amb expressió leucèmica es basa fonamentalment en l'estudi integrat de la morfologia i l'immunofenotip de les cèl.lules leucèmiques, així com de les característiques citogenètiques i moleculars. Així doncs, existeixen una sèrie d'entitats que poden ser confoses fàcilment i requereixen un estudi molt exhaustiu que permeti la seva classificació correcta (Woessner i col., 1991; Harris i col., 1994; Harris i col., 1999; Pangalis i col., 1999). Dins d'aquest grup de malalties trobem la leucèmia limfàtica crònica (LLC-B) amb les seves formes típica i atípica, la leucèmia prolimfocítica crònica B (LPL-B), el limfoma esplènic de la zona marginal (LEZM) i el limfoma de cèl.lules

del mantell (LCM) leucemitzat, entre d'altres. En determinades ocasions, aquestes patologies poden mostrar morfologies semblants, així com els mateixos marcadors immunològics (Taula 5), i la seva classificació correcta pot esdevenir difícil.

Taula 5. Característiques immunològiques d'algunes neoplàsies de cèl.lules B madures amb expressió perifèrica

Entitats	Immunofenotip				
	CD19	CD20	CD5	CD23	IgS
LLC-B	+	+	+	+/-	dèbil
LPL-B	+	+	+/-	-	intens
LEZM	+	+	+/-	-/+	intens
LCM	+	+	+	-/+	intens

LLC-B: Leucèmia Limfàtica Crònica B; LPL-B: Leucèmia Prolimfocítica Crònica B;

LEZM: Limfoma Esplènic de la Zona Marginal; LCM: Limfoma de Cèl.lules del Mantell.

En aquests casos seria molt interessant trobar algun marcador citogenètic que permetés separar les esmentades entitats, de manera que fos possible establir un diagnòstic diferencial amb certesa.

En el present treball s'han escollit tres de les esmentades entitats, concretament la LLC-B forma atípica, el LCM leucemitzat i el LEZM amb expressió hemoperifèrica, amb la intenció d'estudiar-les des del punt de vista citogenètic i amb tècniques d'hibridació *in situ* per intentar definir alteracions citogenètiques específiques de cada grup que permeti fer-ne una millor classificació diferencial.

1.4. DESCRIPCIÓ DE LES ENTITATS ESTUDIADES

1.4.1. Leucèmia limfàtica crònica B (LLC-B)

1.4.1.1. Introducció i epidemiologia

La leucèmia limfàtica crònica B (LLC-B) fou descrita per primera vegada per Turk, el 1903. Minot i Isaacs, el 1924, van dur a terme els primers estudis sobre les particularitats clíniques i evolutives d'aquesta. La LLC-B, que afecta principalment individus d'edat avançada, es caracteritza per la proliferació i acumulació monoclonal de cèl·lules limfoides B, els limfòcits B madurs, ja siguin verges/immunoincompetents, o bé immunocompetents, els quals ja han entrat en contacte amb l'antígen en el centre germinal.

Aquesta patologia és la leucèmia més freqüent entre les persones adultes als països occidentals. La mitjana d'edat al diagnòstic és de 65 anys, és molt poc freqüent en individus menors de 40 anys i predomina lleugerament en el sexe masculí (1.5/1) (Rozman i Montserrat, 1995; Montserrat i col., 1997). La incidència de la malaltia varia segons la distribució geogràfica. Als països occidentals representa un 0.8% de totes les neoplàsies i un 30-40% de totes les leucèmies, en canvi, als països orientals és una malaltia molt poc freqüent (3-10% de totes les leucèmies).

1.4.1.2. Etiologia

L'agent causal de la LLC-B és desconegut, tot i que existeixen una sèrie de factors relacionats amb la malaltia. Sembla ser que existirien factors hereditaris que predisposarien a patir LLC-B, ja que s'han descrit força casos de famílies amb diversos membres afectes, i també famílies amb diversos tipus de síndromes limfoproliferatives. S'ha establert que entre familiars de primer grau d'una persona amb LLC-B, el risc de patir la malaltia és de 2 a 7 vegades superior. Per altra banda, en la LLC-B familiar es presenta el fenomen de l'anticipació, és a dir, l'aparició de la malaltia uns 10-15 anys abans en els membres de la segona generació (Yuille i col., 1998). Cal destacar que entre els individus orientals (en els quals, com hem dit, la incidència de LLC-B és

molt baixa) que emigren a països occidentals, no augmenta la incidència de LLC-B al llarg de les generacions, per tant, sembla que aquesta no estaria relacionada amb factors ambientals. Finalment, no es relaciona amb exposició a radiacions ionitzants, i no s'han obtingut resultats concloents en relació a una possible associació amb les característiques socio-econòmiques dels pacients (Linnet i Blattner, 1988).

1.4.1.3. Característiques clíniques

Com a característiques clíniques, és important ressaltar que un 70% dels pacients es diagnostiquen com a conseqüència d'una anàlisi de rutina en la qual destaca una leucocitosi d'entre 20 i $150 \times 10^9/L$, amb limfocitosi absoluta persistent superior a 5.000 elements (60-99%). De totes maneres, és possible diagnosticar una LLC-B amb leucocitosis discretes, amb recomptes leucocitaris inferiors a $10 \times 10^9/L$ i menys de 5000 limfòcits, en el període preclínic. Els símptomes més freqüents són adenopaties generalitzades, astènia i una història prèvia d'infeccions recurrents degut a la hipogammaglobulinèmia que presenten aquests malalts i a l'alteració de la funció dels limfòcits T en la immunitat. A diferència del que té lloc en els limfomes, en la LLC-B, la febre, la sudoració i la pèrdua de pes són poc freqüents (Rozman i Montserrat, 1995; Montserrat i col., 1997). L'exploració física pot ser completament normal. Aproximadament en un 40% dels pacients es detecten adenopaties de caràcter simètric (les adenopaties mediastíniques o la infiltració de l'anell de Waldeyer són molt poc freqüents). Un 20-30% dels casos presenten esplenomegàlia i no es estranya la troballa d'hepatomegàlia. Els infiltrats limfoides en teixits extralimfàtics com pulmó, pleura, pell o sistema nerviós central poden detectar-se de forma excepcional. El curs clínic és molt variable, amb una mitjana de supervivència de 8-10 anys. Hi ha pacients que moren pocs mesos després del diagnòstic mentre que d'altres gairebé no veuen modificada la seva esperança de vida. Excepcionalment, la malaltia pot remetre espontàniament després d'haver passat per una infecció vírica (1% dels casos) (Montserrat, 2000).

1.4.1.4. Característiques ontogèniques, histològiques, morfològiques i immunològiques

Fins fa pocs anys, s'havia pensat sempre que el limfòcit petit de la LLC-B procedia de l'acumulació de limfòcits B petits *naïve*, que no havia entrat en contacte amb l'antígen. Alguns estudis recents han posat en entredit aquesta idea. Estudiant l'estat de mutació de les cadenes pesades de les immunoglobulines (IgH) dels limfòcits de la LLC-B, s'ha vist que existeixen dos tipus de limfòcits, aquells que tenen les IgH mutades i aquells que no les tenen mutades (Damle i col., 1999; Hamblin i col., 1999). Tal i com s'explica en l'apartat 1.2.2.2.2., el procés d'hipermutació somàtica és una mesura indirecta per saber si el limfòcit B ha entrat en contacte amb l'antígen, és a dir, si ha entrat en el centre germinal. Dels estudis de Damle i col. (1999) i Hamblin i col. (1999) es dedueix que existeixen dos tipus de limfòcits B que poden donar lloc a la LLC-B, els limfòcits verge o *naïve* que no han entrat en contacte amb l'antígen, i que no tenen hipermutacions somàtiques a les IgH, i els limfòcits que ja han entrat en contacte amb l'antígen, per tant, presenten hipermutacions somàtiques a les IgH. Els limfòcits B petits, tant el verge com el que té memòria antigènica, són morfològicament indistingibles. Sembla que per alguns autors, la positivitat per CD27 permetria diferenciar el limfòcit B verge (CD27-) del limfòcit B amb memòria (CD27+) (Klein i col., 1998) (Figures 3 i 5, p. 12 i 28).

Histològicament, la biòpsia de medulla òssia pot presentar diferents patrons d'infiltració: nodular, intersticial, mixte i difús. En el patró nodular es pot observar una infiltració per nòduls limfoides amb conservació del greix i cel·lularitat hematopoètica normal. Els nòduls mai se situen al costat de les trabècules òssies, com en el limfoma centrefol·licular. El patró intersticial presenta una infiltració limfocitària intersticial, amb la cel·lularitat hemopoètica i el greix conservats. El patró mixte consisteix en una combinació dels dos patrons anteriors (nodular+intersticial). Els tres patrons anteriors solen observar-se en fases inicials de la malaltia. El patró d'infiltració difús, que s'observa en estadis més avançats, presenta una gran infiltració limfocitària, que gairebé desplaça del tot la cel·lularitat hematopoètica normal i el greix.

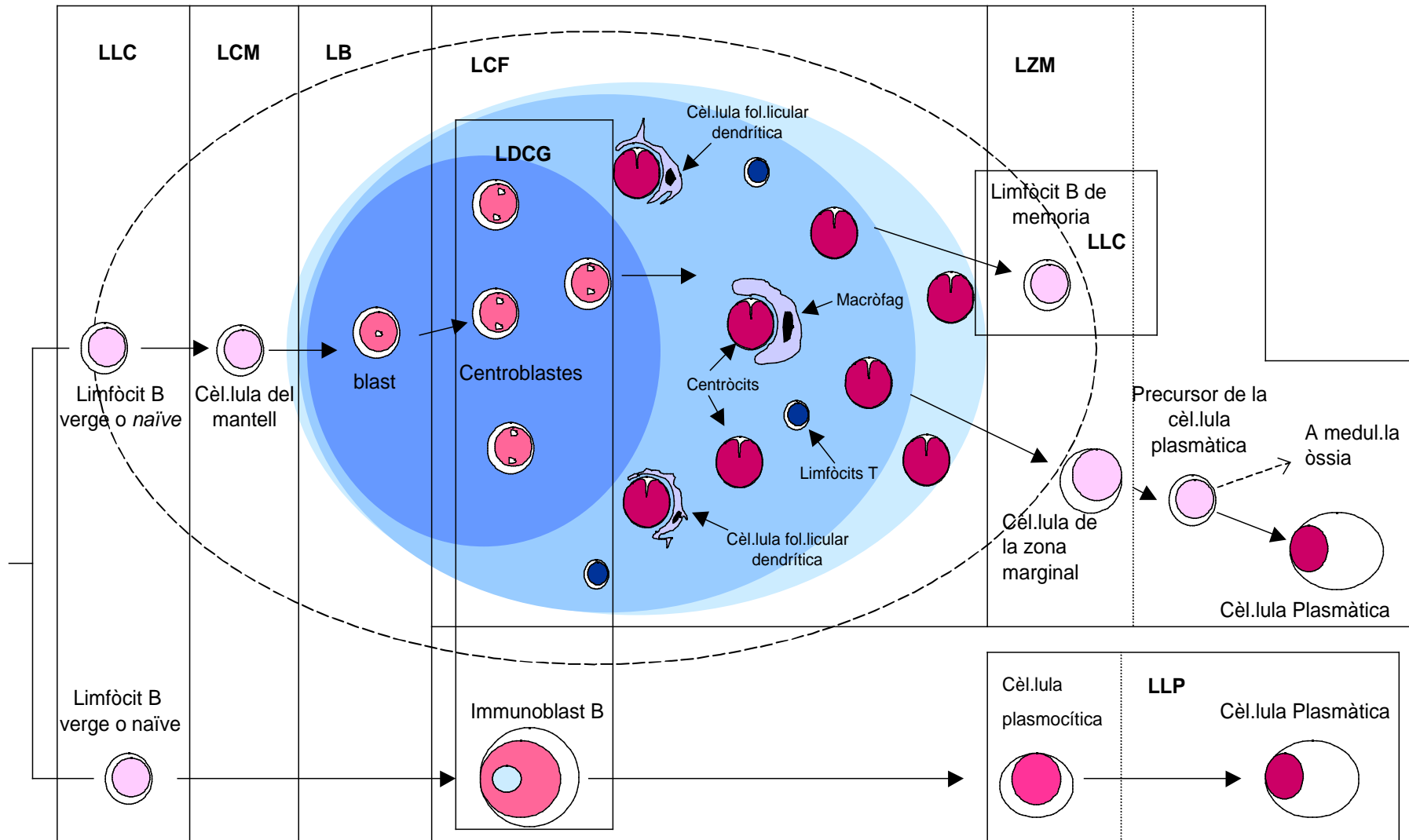


Figura 4. Representació esquemàtica del punt de partida d'alguns tipus de limfomes de cèl·lules B en el fol·licle limfoid secundari (veure abreviatures en el text).

En el gangli limfàtic també es detecta una infiltració difusa per limfòcits petits, que poden ser d'aspecte típic barrejats amb d'altres d'aspecte atípic (tal com es descriu a la morfologia). Existeixen tres patrons histopatològics d'infiltració: el patró difús, en el qual la infiltració per limfòcits petits és gairebé total, el patró pseudofol·licular, en el qual apareixen agregats cel·lulars formats per prolimfòcits i paraimmunoblastes, i el patró tumoral, en el qual es troben zones àmplies del tall histològic infiltrades per limfòcits atípics.

En la melsa, la infiltració afecta principalment la polpa blanca en forma de nòduls limfoides sense centre clar reactiu. Algunes vegades la polpa vermella també es pot veure afectada. En les fases més avançades de la malaltia es pot trobar infiltració neoplàsica en els sinusoides esplènics i en els cordons medul·lars (Montserrat, 2000).

Des del punt de vista morfològic, a la sang perifèrica, la LLC-B presenta un espectre de formes que van des del limfòcit petit, característic de la malaltia, fins als limfòcits de tipus estimulat i/o centròcític. El limfòcit característic o "típic" de la LLC-B és una cèl·lula petita, amb un nucli arrodonit, cromatina condensada en forma de grumolls (*grumelée*), nuclèols molt petits o no visibles i citoplasma escàs. Aquesta cèl·lula és molt fràgil i es trenca amb facilitat a l'hora de fer les extensions de sang perifèrica, de manera que dona lloc a les típiques ombres de Gumprecht. La classificació de l'OMS (Harris i col., 1999), basant-se principalment en la classificació feta anteriorment per la FAB (Bennet i col., 1989), ha proposat les següents variants morfològiques:

1. LLC-B típica: quan >90% dels limfòcits són dels que anomenem "típics" i <10% són limfòcits "atípics" (limfòcits estimulats, centròcits i prolimfòcits bàsicament) a sang perifèrica.

2. LLC-B atípica, que inclou la forma mixta i la LLC-B amb augment de prolimfòcits (LLC-B/LPL-B):

En la forma mixta, coexisteixen els prolimfòcits en un nombre inferior al 10% i unes cèl·lules grans pleomòrfiques, anomenades cèl·lules estimulades, que destaquen per la seva mida gran i per presentar un citoplasma basòfil ampli que s'adapta als hematies que l'envolten. El nucli d'aquests limfòcits estimulats mostra una cromatina moderadament condensada i es poden apreciar un o diversos nuclèols. La forma mixta de la LLC-B també pot presentar centròcits.

En la LLC-B atípica amb augment de prolimfòcits (LLC-B/LPL-B), el nombre d'aquestes cèl.lules se situa entre l'11 i el 55%.

Quan el nombre de prolimfòcits és >55%, es considera que estem davant d'una Leucèmia Prolimfocítica Crònica B (LPL-B).

Quan s'estudia l'aspirat de medul.la òssia es pot detectar una infiltració limfoide pels mateixos limfòcits.

L'immunofenotip del limfòcit de la LLC-B presenta una sèrie de marcadors de superfície característics, com són HLA-DR, CD19, CD20 (dèbil), CD21, CD23 i CD24. També expressa CD5, antígen de diferenciació característic de les cèl.lules T. De fet, la LLC-B correspon a una expansió monoclonal de limfòcits CD5+. Aquesta entitat també es caracteritza per expressar de forma dèbil les immunoglobulines de superfície, que són IgM o bé IgM+IgD; les cadenes lleugeres poden ser kappa o lambda (Taula 5). Matutes i col. (1994a) varen proposar un sistema per a separar immunològicament les LLC-B de la resta de neoplàsies de cèl.lules B perifèriques, que inclou com a marcadors IgS, CD5, CD23, FMC7 i CD22. Segons aquest sistema de puntuació (Taula 6) un individu pot tenir des d'un valor de 0 fins un valor de 5.

Taula 6. Sistema immunològic de classificació de les LLC-B (segons Matutes i col., 1994a)

Marcadors de membrana	Punts	
	1	0
IgS	dèbil	moderat/fort
CD5	positiu	negatiu
CD23	positiu	negatiu
FMC7	negatiu	positiu
CD22	dèbil/negatiu	moderat/fort

Cada pacient pot tenir un n^o de punts des d'un mínim de 0 fins un màxim de 5.

De l'estudi fet en 666 neoplàsies de cèl.lules B perifèriques, de les quals, 400 eren LLC-B, els valors de 5 es corresponien a LLC-B típiques i els valors de 0 a LLC-B atípiques morfològicament. Un 87% de les LLC-B varen presentar valors de 4 i 5 i només un 0.4% varen presentar valors de 0 i 1. En canvi, el 89% de la resta de neoplàsies de cèl.lules B perifèriques no LLC-B varen presentar valors entre 0 i 1.

Tot i això, l'expressió d'alguns d'aquests marcadors pot variar com a aberració fenotípica de la pròpia malaltia, de manera que, per exemple, existeix la definició de LLC-B atípica immunològicament, en la qual, la morfologia és la típica de la LLC-B però les cèl.lules leucèmiques presenten alguna característica immunofenotípica inusual (CD23-, CD5-, FMC7+, CD11c+, IgS d'intensitat forta, etc.).

1.4.1.5. Característiques citogenètiques i gèniques

L'aplicació de les tècniques de citogenètica convencional ha permès detectar alteracions cromosòmiques clonals en un 40-50% dels casos de LLC-B (Juliussen i Gahrton, 1990; Juliussen i col., 1990; Juliussen i col., 1991). El principal problema amb el qual s'han trobat els citogenetistes ha estat el fet d'haver de fer entrar en divisió el limfòcit B leucèmic, pel qual no s'ha trobat un mitògen prou específic. Durant les dècades dels 60 i 70, la major part d'estudis citogenètics de la LLC-B es varen realitzar en sang perifèrica estimulada amb fitohemaglutinina (mitògen que estimula preferentment la divisió dels limfòcits T) i gairebé tots mostraren un cariotip normal, atribuïble a la divisió dels limfòcits T no leucèmics (Autio i col., 1986). En una revisió feta per Mitelman i Levan el 1978, que correlacionava alteracions citogenètiques amb neoplàsies, no es va definir cap alteració associada específicament a la LLC-B (Mitelman i Levan, 1978). Cap a finals de la dècada dels 70 es varen començar a usar altres mitògens (Taula 7) per estimular els limfòcits B (Robèrt i col., 1978; Gahrton i col., 1980a) i va ser quan es varen començar a descriure les alteracions cromosòmiques específiques d'aquesta patologia (Autio i col., 1979; Gahrton i col., 1980b, Hurley i col., 1980).

Taula 7. Principals mitògens utilitzats en l'estudi citogenètic de la LLC-B (Crawford i Catovsky, 1993; Döhner i col., 1993; Oscier, 1994)

Mitògens

Fitohemaglutinina (PHA)

Acetat de miristat de tetraforbol (TPA)

Virus d'Epstein-Barr (VEB)

Lipopolisacàrid d'Escherichia coli (LPS)

Pokeweed mitogen (PWM)

Citocalasina B

IgM anti humana

Factor de creixement de cèl.lules B

Ionòfor de calci

Anticòs anti-CD40

La introducció de les tècniques de citogenètica molecular (concretament les tècniques d'hibridació in situ) a l'estudi de la LLC-B ha permès augmentar la capacitat de detectar determinades alteracions cromosòmiques, no tansols en cèl.lules en metafase sinó també en nuclis en interfase (Cremer i col., 1986; Lichter i col., 1995). La tècnica de la citogenètica interfàsica ha estat molt útil per a redefinir les incidències de les principals alteracions cromosòmiques en aquesta malaltia.

Les alteracions cromosòmiques característiques descrites en la LLC-B han estat la trisomia del cromosoma 12, les delecions i translocacions (aquestes últimes menys freqüents) del braç llarg del cromosoma 13, en concret a la regió 13q14, les delecions de 11q, de 6q i de 17p. Per altra banda també s'han descrit translocacions equilibrades com és el cas de la t(11;14)(q13;q32), la t(14;18)(q32;q21) i la t(14;19)(q32;q13). Les sèries més llargues que descriuen les alteracions cromosòmiques per citogenètica convencional en la LLC-B han estat les del *First* i *Second International Working Party on Chromosomes in CLL* (IWCCLL) (Juliusson i col., 1990; Juliusson i col., 1991). A la taula 8 es mostren els resultats de la *Second International Working Party on Chromosomes in CLL*, en la qual es varen analitzar 662 pacients, 604 avaluables citogenèticament, procedents d'onze institucions diferents.

Taula 8. Comparació de la freqüència de les alteracions cromosòmiques específiques de la LLC-B determinada per citogenètica convencional (*Second IWCCLL*) i per citogenètica interfàsica (*Heidelberg study*) (Döhner i col., 1999)

Alteracions citogenètiques	Citogenètica convencional*		Citogenètica interfàsica•	
	n	%	n	%
Trisomia 12	112/604	19	36/245	15
Alteracions de 13q	62/604	10	129/245	53
Alteracions d'11q	49/604	8	48/250	19
Alteracions de 6q	36/604	6	18/208	9
Alteracions de 17p	22/604	4	20/243	8

* Les alteracions estructurals de 13q afecten principalment la regió 13q14 i les alteracions estructurals d'11q afecten les bandes 11q13 (14 casos), 11q14 (6 casos) i 11q23 (5 casos).

• Les delecions de 13q es varen determinar amb sondes pel gen RB1 i el locus D13S25, les delecions d'11q amb un clon d'un YAC que contenia la regió 11q22.3-q23.1, les delecions de 6q amb dos clons de YAC que mapaven a les regions 6q21 i 6q27 i les delecions de 17p amb la sonda pel gen TP53.

La citogenètica interfàsica ha permès dissenyar sondes específiques que faciliten la identificació de les principals alteracions numèriques i estructurals de la LLC-B. El *Heidelberg interphase cytogenetic study* (Döhner i col., 1999; Döhner i col., 2000) ha dissenyat un conjunt de sondes que inclou la detecció de la trisomia 12 i la delecio de les regions 13q14, 11q22.3-q23.1, 6q21-q27 i 17p13. Les freqüències d'aquestes alteracions cromosòmiques varien molt si s'estableixen seguint les tècniques de citogenètica convencional o de citogenètica interfàsica (Taula 8). Aquestes diferències no s'expliquen per una selecció de pacients sinó per les diferències entre els mètodes utilitzats. La incidència real d'alteracions cromosòmiques s'obté de l'estudi interfàsic.

Tot i que els estudis citogenètics i d'hibridació in situ han permès determinar les regions del genoma implicades en la malaltia, amb delimitació d'una o de poques bandes cromosòmiques, només s'ha pogut identificar un gen candidat, el gen TP53 localitzat a 17p13.

Tot seguit es fa una revisió de les alteracions cromosòmiques recurrents en la LLC-B i dels possibles gens candidats.

•Delecions i translocacions de 13q14

Les alteracions estructurals del cromosoma 13 es varen descriure a finals dels anys 80 (Ross i Stockdill, 1987; Zech i Mellstedt, 1988). Gràcies als estudis de citogenètica interfàsica s'ha establert que l'afectació de 13q a la banda 13q14 és l'alteració cromosòmica més freqüent en la LLC-B (53%) (Oscier i col., 1990; Peterson i col., 1992; Döhner i col., 1999; Döhner i col., 2000). La majoria de casos presenten delecions, tot i que també s'han descrit translocacions equilibrades que afecten regions tan petites que es troben al límit del nivell de resolució de la citogenètica convencional i sovint passen desapercebudes.

Es pensa que les delecions a 13q14 a la LLC-B donen lloc a la inactivació d'un gen supressor de tumors seguint la hipòtesi de Knudson (1971), és a dir, per pèrdua d'un al·lel i mutació de l'al·lel restant. Un exemple d'aquesta hipòtesi és el que succeeix amb el gen del retinoblastoma (RB1), situat a 13q14. Les mutacions al gen RB1 s'han descrit a molts tipus de tumors sòlids humans (Weinberg, 1992). En un principi, es va pensar que potser aquest gen estava implicat en la patogènia de la LLC-B, ja que per tècniques de biologia molecular es van trobar delecions del mateix en casos de LLC-B que presentaven del(13)(q14) (Liu i col., 1992; Stilgenbauer i col., 1993; Döhner i col., 1994). Tot i això, diferents fets semblen indicar que el gen supressor de tumors putatiu situat a 13q14 no seria el gen RB1: 1) Diversos estudis han demostrat que molts casos de LLC-B amb delecio a 13q14 no presenten mutacions a l'al·lel restant (Liu i col., 1993), 2) Diferents grups han demostrat que les delecions no afecten el gen RB1, sino que es troben a una regió més propera al telòmer (Brown i col., 1993; Chapman i col., 1994; Corcoran i col., 1998). S'han realitzat diferents estudis incloent la regió en BACs, PACs i còsmids per intentar identificar el gen putatiu, però encara no s'ha arribat a una conclusió consensuada, probablement degut a la heterogeneïtat genètica que existeix entre els diferents tumors i a que la regió que es perd és variable. Liu i col.laboradors van descriure una delecio homozigota de 10 Kb a D13S272 i hi varen localitzar dos gens candidats: LEU1 i LEU2 (Liu i col., 1997); quan s'ha realitzat l'anàlisi de mutacions per aquests gens en l'altre al·lel, s'ha vist que

aquestes eren inexistents. Per això, es pensa que cap d'aquests dos gens correspon al gen putatiu. Altres grups estan treballant a 13q14 i han delimitat altres regions, telomèriques a D13S272, però no s'hi ha descrit cap altre gen fins el moment (Bouyge-Moreau i col., 1997; Kalachikov i col., 1997). Un tercer gen s'ha descrit en aquesta regió, el gen LEU5, homòleg a algunes proteïnes amb estructura de dits de zinc involucrat en el càncer, però no s'ha demostrat que estigui alterat en la LLC-B (Kapanadze i col., 1998). García-Marco i col.laboradors (1996) van descriure una elevada freqüència de delecions del gen BRCA2, mapat a la banda 13q12, independents de l'existència de delecions del locus D13S25 situat a 13q14. L'existència d'aquestes delecions no ha estat posteriorment confirmada per altres grups (Panayiotidis i col., 1997).

En conclusió, sembla que existeix un gen supressor de tumors a 13q14 que tindria un paper important en la patogènesi de la LLC-B, però que encara no ha estat identificat.

• Delecions de les bandes cromosòmiques 11q22.3-q23.1

Les delecions que afecten les bandes 11q21-25, gairebé sempre concentrades a la regió 11q22.3-q23.1, constitueixen una de les anomalies estructurals més freqüents a les síndromes limfoproliferatives cròniques (Johansson i col., 1993). En els estudis cromosòmics de la LLC-B, aquesta alteració s'ha infraestimat, ja que, per exemple, en la *Second* IWCCLL (Juliusson i col., 1991) menys d'un 5% de casos presentaven aquesta alteració. En algunes sèries llargues de LLC-B analitzades per citogenètica convencional tampoc s'ha reflectit la presència d'alteracions a la regió 11q22-23 (Hernández i col., 1995; Matutes i col., 1996; Geisler i col., 1997); ha estat en sèries més petites on s'ha emfatitzat l'existència d'aquesta alteració citogenètica (Ross i Stockdill, 1987; Zech i Mellstedt, 1988; Fegan i col., 1995; Neilson i col., 1997). Quan s'utilitzen sondes de FISH en interfase específiques per aquesta regió s'arriba a la conclusió que les delecions de 11q són la segona alteració cromosòmica més freqüent a la LLC-B (20%), després de les delecions de la regió 13q14, fins i tot més freqüent que la trisomia 12, que havia estat descrita com a l'alteració més comuna utilitzant la tècnica de citogenètica convencional (Döhner i col., 1997) (Taula 8).

La pèrdua recurrent de material cromosòmic a 11q21-25 també ha suggerit, com en el cas de 13q14, la possible localització d'un gen supressor de tumors en aquesta regió. S'han realitzat diversos estudis amb còntigs de YACs (*yeast artificial chromosomes*) per delimitar el segment comú que es delecta en la majoria de LLC-B i s'ha definit una regió crítica de 2-3 Mb a les bandes 11q22.3-q23.1 implicada en totes les delectacions i translocacions d'aquesta zona (James i col., 1994; Stilgenbauer i col., 1996a). En aquesta regió genòmica es troben els gens que codifiquen ACAT1, NPAT, ATM, DDX10, RXD i FDX1. De tots aquests gens, els gens RDX (*radixina*) i ATM (*ataxia telangiectasia mutated*) podrien ser gens supressors de tumors potencials. El gen RDX presenta homologies amb el gen de la neurofibromatosi tipus 2 (NF2) (Wilgenbus i col., 1993). El gen ATM codifica una proteïna homòloga a la fosfatidilinositol-3 kinasa, implicada en la reparació de l'ADN, la recombinació i el control del cicle cel.lular. En cas que ambdós al.lels d'aquest gen estiguin mutats, apareix l'Atàxia Telangiectàsia, malaltia neurològica progressiva que es caracteritza per una inestabilitat cromosòmica i una reparació de l'ADN deficient. En estudis fets en ratolins *knock-out* per ATM i en tumors humans s'ha vist que el gen ATM té una funció supressora del creixement de tumors. Quan ATM està mutat, apareix una tendència a desenvolupar neoplàsies de cèl.lules B i T (Taylor i col., 1996). En els casos que presenten delectió d'un dels dos al.lels del gen ATM (majoritàriament en forma de delectacions intragèniques petites), l'altre al.lel ha presentat, sovint, mutacions sense sentit, fet que indica la possible funció com a supressor de tumors d'ATM (Stankovic i col., 1999). De totes maneres, no en totes les LLC-B s'ha trobat aquest gen mutat. Es postula que podria ser que ATM no fos el gen supressor de tumors putatiu sinó que el fet de tenir ATM mutat, associat a un altre esdeveniment, iniciaria o acceleraria la progressió leucèmica (Bullrich i col., 1999). Altres gens que podrien estar implicats serien els gens PPP2R1B, IL1BC i els de les caspases 1, 4 i 5 (Lichter i col., 1999; Stilgenbauer i col., 1999a)

• Trisomia 12

La trisomia 12 ha estat l'alteració citogenètica per excel·lència associada a la LLC-B. Aquesta és l'alteració numèrica més comuna en la patologia que tractem, amb una freqüència que varia entre el 7 i el 25% per citogenètica convencional (Juliusson i Gahrton, 1990). Tots els estudis que han comparat la detecció de la trisomia 12 per tècniques convencionals i per FISH mostren que es troba una incidència més alta quan s'utilitzen sondes de la regió centromèrica del cromosoma 12. La incidència per FISH se situa entre un 11 i un 30% (Anastasi i col., 1992). Aquesta alteració, clàssicament, s'ha associat a les formes atípiques morfològicament de la malaltia, en les quals la freqüència augmenta fins un 33-63% (Que i col., 1993; Criel i col., 1994; Woessner i col., 1994; Matutes, 1996; Matutes i col., 1996; Woessner i col., 1996; Bigoni i col., 1997; Criel i col., 1997) (Taula 9). La majoria de vegades, aquesta alteració es presenta com una trisomia total del cromosoma 12, tot i que en alguns casos s'ha descrit una trisomia parcial que afecta les bandes 12q13-q21.2 (Gahrton i col., 1982; Döhner i col., 1993; Döhner i col., 2000), fet que indicaria que aquesta és la regió portadora del/s gen/s involucrat/s en la patogènesi de la malaltia. S'han avaluat una sèrie de gens candidats situats al cromosoma 12 que inclouen CDK2 (12q13), CDK4, HMGI-C, MDM2 (12q13), TEL (12p13) i BCL7 (12q24). Alguns d'aquests gens s'han trobat sobreexpressats en aquesta malaltia, però no s'ha pogut demostrar l'associació de cap d'ells amb la LLC-B (Bueso-Ramos i col., 1993; Bullrich i col., 1995; Oscier, 1999). El mecanisme pel qual la trisomia 12 contribueix al procés leucèmic és encara desconegut. Gràcies al estudis fets amb microsatèl·lits, s'ha pogut definir que la trisomia apareix per duplicació d'uns dels dos al·lels degut a una no-disjunció mitòtica, no pas per pèrdua d'un al·lel i triplicació de l'altre (Einhorn i col., 1989).

Taula 9. Detecció d'alteracions citogenètiques en la LLC-B per FISH (i en alguns casos amb citogenètica convencional) (Döhner i col., 1999)

Alteració citogenètica	Grup	Localització	N total	FISH		CC (%)
				n	%	
Trisomia 12*	Pérez-Losada i col., 1991	Helsinki-Barcelona	15	2	13	7
	Anastasi i col., 1992	Chicago	50	18	36	23
	Raghoebier i col., 1992	Leiden	67	8	11	SD
	Döhner i col., 1993	Heidelberg	45	8	18	11
	Escudier i col., 1993	Houston	117	41	35	6
	Que i col., 1993	Londres	183	21	12	9
	Criel i col., 1994	Brugge, Leuven	111	16	14	12
	Arif i col., 1995	Hiroshima	42	8	19	SD
	Matutes i col., 1996	Londres i altres	544	97(18)**	-	-
	Woessner i col., 1996	Barcelona	61	7	11.5	6.5
	Döhner i col., 1997	Heidelberg	214	32	15	SD
del(13)(q14)	Stilgenbauer i col., 1993	Heidelberg	35	11	31	11
	Arif i col., 1995	Hiroshima	42	12	29	SD
	Döhner i col., 1997	Heidelberg	214	96	45	SD
del(11)(q22.3-q23.1)	Döhner i col., 1997	Heidelberg	214	43	20	SD
del(17)(p13), TP53	Döhner i col., 1995	Heidelberg	100	17	17	SD
	Döhner i col., 1997	Heidelberg	214	20	10	SD
del(6)(q21)	Stilgenbauer i col., 1996b	Heidelberg	208	18	9	SD

* Dades de trisomia 12 sense tenir en compte subgrups morfològics; ** Combinació de dades de citogenètica convencional i FISH; SD: sense dades

- Delecions de 6q

La pèrdua de material genètic del braç llarg del cromosoma 6 és una alteració freqüent a les neoplàsies limfoides. A la LLC-B, la *second* IWCCLL (Juliusson i col., 1991) detecta un 6% d'alteracions estructurals en aquesta zona, essent les bandes 6q15 i 6q23 les més afectades.

Els estudis moleculars, per anàlisi de RFLPs (restriction fragments length polymorfisms), han identificat dues regions independents que es delecionen amb freqüència als limfomes malignes, una situada a 6q21-q23 i l'altra a 6q25-q27 (Offit i col., 1993). Sembla que les delecions de 6q21-q23 s'associen al limfoma de limfòcits petits (LLPe), que representa l'expressió limfomatososa de la LLC-B (Offit i col., 1994). Utilitzant sondes específiques de locus sobre nuclis en interfase per les esmentades regions, s'ha determinat que un 9% de LLC-B presenten delecions de 6q, amb afectació preferent de les bandes 6q21-q23, tot i que comptats casos també presenten delecions de les bandes 6q25-27 (Gaidano i col., 1994; Stilgenbauer i col., 1996b; Stilgenbauer i col., 1999b). Si bé sembla que s'ha identificat la regió candidata, encara no s'ha definit quin podria ser el gen putatiu afectat en aquesta zona.

- Delecions de la regió 17p13

Els estudis citogenètics en la LLC-B mostren l'existència d'alteracions estructurals del braç curt del cromosoma 17 en aproximadament un 4% dels casos (Juliusson i col., 1991). Tan sols un centre ha descrit una incidència més elevada (16%) utilitzant aquesta tècnica (Bird i col., 1989).

És ben sabut que a la regió 17p13 s'hi localitza el gen TP53 que codifica la proteïna p53, factor regulador del cicle cel.lular i de l'apoptosi. El gen TP53 és un gen supressor de tumors que té un paper molt important en el control de la mort cel.lular programada (Gottlieb i Oren, 1998). La implicació d'aquest gen a diverses neoplàsies limfoides, incloent la LLC-B, ha estat demostrada per diversos estudis de mutacions en aquesta regió (tècniques de SSCP (*single strand conformational polymorphism*) i de seqüenciació). Els estudis per SSCP determinen que entre un 10% i un 15% de les LLC-B presenten mutacions puntuals de TP53 (Gaidano i col., 1991; Fenaux i col., 1992; El Rouby i col., 1993; Gaidano i col., 1994). Aquest fet, afegit a la deleción del segon al.llel, fa que es manifesti el fenotip d'alteració de l'apoptosi, que només s'observa en

cas de tenir tots dos al·lels mutats, ja que és de caràcter recessiu. També s'han realitzat estudis de FISH utilitzant la sonda genòmica de TP53 per a detectar delecions al·lèliques d'aquest gen a la LLC-B (Döhner i col., 1995; Döhner i col., 1997; Döhner i col., 2000). El resultat ha estat la detecció d'un 7-9% de delecions monoal·lèliques. En general, doncs, i per tècniques moleculars, es pot dir que les delecions de 17p13 afecten un 7-15% de casos de LLC-B (Taula 10).

Taula 10. Detecció de mutacions o delecions gèniques de TP53 utilitzant les tècniques de SSCP o de FISH (Döhner i col., 1999; Döhner i col., 2000)

Grup	Mètode	Detecció de mutacions a TP53	
		Nº casos mutats	% casos mutats
Gaidano i col., 1991	SSCP	6/40	15
Fenaux i col., 1992	SSCP	4/39	10
El Rouby i col., 1993	SSCP	8/53	15
Gaidano i col., 1994	SSCP	10/100	10
Döhner i col., 1995	FISH	11/90	12
Döhner i col., 1997	FISH	20/214	9
Döhner i col., 2000	FISH	23/325	7

- Afectació del locus IgH a la banda 14q32

En la LLC-B també s'han descrit alteracions estructurals que afecten el cromosoma 14 a la banda 14q32 on es localitza el gen que codifica per la cadena pesada de les immunoglobulines (IgH). En una primera etapa es va descriure l'existència de la translocació equilibrada t(11;14)(q13;q32) a les formes atípiques de la LLC-B (Brito-Babapulle i col., 1992). Aquesta translocació és característica del limfoma de cèl·lules del mantell (LCM) i afecta el gen *bcl-1* (*B-cell lymphoma -1*), també anomenat *CCND1*, situat a 11q13, que codifica per una proteïna anomenada ciclina D1. Posteriorment s'ha vist que la majoria de casos de LLC-B portadors de la t(11;14) eren en realitat LCM leucemitzats, de forma que cal anar amb molt de compte a l'hora de classificar les síndromes limfoproliferatives portadores de l'anomenada alteració (International Workshop

on Chronic Lymphocytic Leukemia, 1989; Newman i col., 1993; Bosch i col., 1994).

Per altra banda, també s'ha descrit l'existència de la t(14;18)(q32;q21) i les seves variants t(2;18)(p11;q21) i t(18;22)(q21;q11) a la LLC-B. Aquestes alteracions s'associen freqüentment al limfoma centrefol·licular (LCF) (85-90% casos) i al limfoma difús de cèl·lula gran (LDCG) (12-30% casos). L'anàlisi molecular d'aquestes translocacions mostra que els segments JH de la cadena pesada (IgH) o bé de les cadenes lleugeres kappa o lambda (situats a les bandes cromosòmiques 14q32, 2p11 i 22q11 respectivament) queden situats al costat del protooncogen bcl-2 (*B-cell lymphoma-2*) mapat a 18q21. Així com en el LF i en el LDCG, el trencament del gen bcl-2 per produir el reordenament té lloc preferentment a les regions MBR (*major breakpoint region*) o mcr (*minor cluster region*) situades a 3' del gen, en la LLC-B s'ha descrit una regió de trencament anomenada VCR (*variable cluster region*) situada a 5' del gen i és més freqüent la juxtaposició del bcl-2 a una de les cadenes lleugeres (translocacions variants). Tot i això, les alteracions estructurals que afecten bcl-2 s'han descrit només en un 1-2% dels casos de LLC-B (Adachi i col., 1989; Adachi i col., 1990; Dyer i col., 1994; Willis i Dyer, 2000).

Finalment, s'han descrit alguns casos de LLC-B associats a la t(14;19)(q32;q13). A la banda 19q13 s'hi localitza el gen bcl-3, que s'ha trobat implicat en diverses síndromes limfoproliferatives cròniques (Michaux i col., 1996). Aquesta alteració s'ha associat a formes d'aparició en individus joves i amb pronòstic desfavorable. També s'ha comunicat l'existència de la t(2;14)(p13;q32) com a alteració citogenètica poc freqüent però recurrent en la "leucèmia limfàtica crònica infantil" (Willis i Dyer, 2000).

De totes aquestes dades es pot treure la conclusió que els reordenaments que afecten la regió 14q32 i els esmentats protooncogens són poc freqüents a la LLC-B, entre l'1% i el 4%. Aquestes translocacions s'associen més freqüentment a altres tipus de síndromes limfoproliferatives cròniques, tot i que els estudis de citogenètica convencional hagin atribuït una major importància a l'afectació 14q32 de la que realment s'ha demostrat que té per estudis de genètica molecular.

1.4.1.6. Correlació entre les alteracions cromosòmiques i gèniques, la morfologia, l'immunofenotip, les característiques clíniques i el pronòstic

Tenint en compte els resultats obtinguts per citogenètica convencional i per hibridació in situ, s'han establert una sèrie de correlacions entre les diferents alteracions cromosòmiques que es troben a la LLC-B i les variants morfològiques, les característiques clíniques i el pronòstic de la malaltia.

Els resultats de la *First IWCCLL* (Juliussen i col., 1990) ja mostraren una correlació entre el cariotip i la supervivència global en els pacients afectes de LLC-B. En els pacients que presentaven un cariotip normal s'observava una supervivència més llarga que en aquells pacients amb alteracions citogenètiques clonals (15 *versus* 7.7 anys respectivament). Per altra banda, els pacients amb cariotips complexes també mostraven una supervivència menor que els pacients amb una única alteració. Tot i això, l'anàlisi multivariant va confirmar que ni la presència d'alteracions clonals ni el nombre d'alteracions clonals eren variables amb un pronòstic independent.

• Delecions i translocacions de 13q14

Les alteracions estructurals de la regió 13q14 s'han associat a les formes morfològicament típiques de la LLC-B, a estadis inicials de la malaltia i a un pronòstic favorable (Neilson i col., 1997). Dels estudis de les IWCCLL es desprèn que els pacients amb afectació de la regió 13q14 presenten unes supervivències comparables amb les dels pacients que presenten un cariotip normal (Juliussen i col., 1990; Juliussen i col., 1991). Aquests resultats s'han obtingut sempre d'estudis fets per citogenètica convencional. Fins a l'actualitat no es disposa d'estudis de supervivència fets a partir de pacients en els quals s'ha trobat la presència de l'alteració cromosòmica per hibridació in situ (Taula 11).

• Delecions de les bandes cromosòmiques 11q22.3-q23.1

Les delecions de 11q, ja en estudis fets per citogenètica convencional, s'han trobat associades a una progressió ràpida de la malaltia i a una supervivència curta (Neilson i col., 1997). Per estudis de citogenètica interfàsica s'han confirmat aquests resultats, i d'aquests es desprèn que la del(11q) és la segona

alteració cromosòmica en ordre d'importància (després de la deleció de TP53 a 17p13) que en anàlisi multivariant esdevé un factor pronòstic independent

Taula 11. Correlacions entre alteracions cromosòmiques específiques, característiques clíniques i supervivència en pacients amb LLC-B (Döhner i col., 1999; Döhner i col., 2000), segons dades obtingudes d'estudis fets per citogenètica convencional i citogenètica interfàsica

Alteració citogenètica	Correlacions morfològiques, clíniques i de supervivència
Trisomia 12	Morfologia atípica Expressió Ig superfície i FMC7 més forta Estadis avançats Intervals lliures de malaltia curts Temps de supervivència curts/ No diferències en temps de supervivència*
Afectació de 13q	Pronòstic favorable
Afectació d'11q	Limfadenopaties en múltiples territoris Estadis avançats Intervals lliures de malaltia curts Temps de supervivència curts Progressió de la malaltia
Afectació de 17p	Intervals lliures de malaltia curts Temps de supervivència curts Resistència al tractament

* Resultats controvertits. Fan falta més estudis per a confirmar quina de les dues afirmacions és la certa.

respecte la supervivència (Döhner i col., 1997). La presència de del(11)(q22.3q23.1) s'associa a un quadre clínic molt característic, de pacients joves, predominantment de sexe masculí, que presenten, al diagnòstic, estadis més avançats de la malaltia. Aquests pacients solen presentar limfadenopaties que afecten múltiples territoris, generalment ganglis limfàtics perifèrics i adenopaties mediastíniques o abdominals, de diàmetre considerable. La

progressió de la malaltia sol ser més ràpida que en aquells pacients que no presenten l'esmentada alteració, fet que es reflexa en uns intervals lliures de malaltia molt més curts que els dels individus que no presenten la del(11q) (9 vs 43 mesos; $p < 0.001$). L'efecte pronòstic de les delecions a 11q sobre la supervivència depèn de l'edat, ja que la mitjana de supervivència en pacients menors de 55 anys és significativament més curta (64 vs 209 mesos; $p < 0.001$), i, en canvi, en els pacients majors de 55 anys no s'observen diferències significatives (94 vs 111 mesos; $p = 0.82$). D'aquestes dades es conclou que en pacients joves, la presència de del(11)(q22.3-q23.1) és un factor important en la predicció de la supervivència (Taula 11).

• Trisomia 12

Com ja s'ha esmentat anteriorment, la presència de trisomia 12 s'associa a la variant morfològica de la LLC-B que s'ha anomenat "atípica", LLC-B/LPL-B o de tipus cel·lulars mixtes. En la forma atípica de la LLC-B, la incidència de +12 és del 33-63% i passa a ser l'alteració cromosòmica més freqüent (veure 1.4.1.4. i 1.4.1.5.). Respecte els estudis de bandes, les *First* i *Second* IWCCLL (Juliussen i col., 1990; Juliussen i col., 1991) van avaluar la supervivència dels pacients amb una única alteració cromosòmica al cariotip, i van concloure que la trisomia 12 era la que presentava un impacte més advers sobre el pronòstic, s'associava a intervals lliures de malaltia curts i a una disminució de la supervivència global. Tot i això, en l'únic estudi que s'ha realitzat utilitzant la tècnica de FISH que avaluava l'impacte pronòstic de la trisomia 12 (Escudier i col., 1993) no es varen observar diferències significatives entre els pacients amb un cariotip normal i aquells que presentaven trisomia 12. La conclusió a la que s'arriba és que no s'han realitzat prou estudis per a determinar si la trisomia 12 és de bon pronòstic, de pronòstic intermig o de mal pronòstic, de manera que la presència d'aquesta alteració no podrà condicionar una conducta clínica específica (Döhner i col., 1999) (Taula 11).

• Delecions de la regió 17p13 que impliquen delecio de TP53

La presència de delecio monoal·lèlica de TP53 comporta implicacions importants pel curs clínic de la malaltia. Döhner i col. (1995) varen descriure que els malalts amb aquesta alteració presentaven uns temps de supervivència global

significativament més curts que els individus que no la presentaven. També van descriure que aquests pacients no responien al tractament amb anàlegs de les purines (Fludarabina, Pentostatina). S'ha vist que en estudis multivariants de la LLC-B, la presència o absència de deleció de TP53 és el factor pronòstic més important respecte la supervivència, per davant d'altres factors importants com l'edat, l'estadi de Rai i els valors d'hemoglobina. Finalment, cal dir que la deleció/mutació de TP53 és la primera alteració genètica que ha demostrat tenir un impacte pronòstic independent a la LLC-B (El Rouby i col., 1993; Döhner i col., 1999; Döhner i col., 2000) (Taula 11).

• Expressió de CD38 i relació amb la presència d'hipermutacions somàtiques a la regió variable dels gens de les cadenes pesades de les immunoglobulines

Recentment, ha aparegut un marcador immunofenotípic d'interès en el pronòstic de la malaltia, el CD38. L'expressió de CD38 ha estat relacionada de forma inversa amb l'existència d'hipermutació somàtica de la regió variable (VH) del gen de les cadenes pesades de les immunoglobulines per alguns grups (Damle i col., 1999). S'ha vist que les LLC-B que presenten aquestes hipermutacions somàtiques tenen un millor pronòstic. Aquestes LLC-B no expressen CD38 (positivitat 30%). En canvi, les LLC-B que no han experimentat hipermutació somàtica (no han passat pel centre germinal), són positives per CD38 (positivitat >30%) i presenten un pronòstic més desfavorable (Damle i col., 1999; Hamblin i col., 1999). Cal esmentar que aquesta correlació entre CD38 i hipermutacions de la VH del gen de les cadenes pesades de les immunoglobulines ha estat discutida i força controvertida (Damle i col., 2000; Hamblin i col., 2000). Actualment existeix un debat entre la comunitat científica, i fan falta més estudis per a acabar-les de confirmar. A la Taula 12 ² es mostra l'associació dels dos subtipus de LLC-B amb altres paràmetres.

² Les dades que es presenten a la taula 12 actualment són subjecte de debat entre la comunitat científica, per això poden variar durant el període d'edició i presentació d'aquesta tesi doctoral. Nota de l'autora.

Taula 12. L'estat de mutació de la regió variable dels gens de la cadena pesada de les immunoglobulines (IgV_H) permet establir dos subgrups de LLC-B amb característiques diferents i implicacions clíniques concretes

IgV_H no mutades, CD38\geq30% positivitat (CD38+)	IgV_H mutades, CD38<30% positivitat (CD38-)
Predominància de sexe masculí	No predominància de sexe
Morfologia atípica	Morfologia típica
Trisomia 12	del(13)(q14)
Formes més greus de la malaltia	Formes més lleus de la malaltia
Estadis avançats, B i C	Estadis inicials, A
Supervivència curta	Supervivència més llarga

1.4.2. Limfoma de Cèl.lules del Mantell (LCM)

1.4.2.1. Introducció i epidemiologia

El limfoma de cèl.lules del mantell (LCM) constitueix una entitat clínico-patològica reconeguda a la classificació REAL (Harris i col., 1994) i també a la classificació de l'OMS (Harris i col., 1999). Aquesta malaltia es caracteritza per l'expansió de l'àrea del mantell dels fol.licles secundaris dels òrgans limfoides, deguda a l'acumulació de limfòcits de mida intermitja. En el passat, el LCM ha estat mal definit sota noms diversos corresponents a diferents classificacions (veure capítol 1.3.). Així, la classificació de Kiel descrita per Lennert va donar-li el nom de "limfoma centrocític" per distingir-lo dels limfomes que provenien de les cèl.lules del centre germinal, als quals va anomenar "limfomes centroblàstics" (Lennert i col., 1975). La *Working Formulation* (Rosenberg i col., 1982), en canvi, no va reconèixer aquest limfoma com una entitat independent, de manera que els patòlegs i hematòlegs del *Southwest Oncology Group* (SWOG) i de l'*European Organization for the Research and Treatment of Cancer* (EORTC) el varen classificar com a limfoma difús de cèl.lula petita clivellada (52%), limfoma fol.licular de cèl.lula petita clivellada (31%), limfoma de limfòcits petits (7%), limfoma fol.licular mixte (4%) limfoma difús mixte (3%) i

altres subtipus de limfomes (3%) (Fisher i col., 1995; Teodorovic i col., 1995). Berard i Dorfman havien anomenat el LCM com a "limfoma limfocític de diferenciació intermitja" o com a "limfoma de cèl.lules intermitges" (Berard i Dorfman, 1974). Per intentar evitar la confusió que generava la multitud de noms donats a aquest limfoma, Banks i col. (1992) varen proposar el nom de "limfoma de cèl.lules de mantell" com a nomenclatura de consens.

El LCM és un limfoma relativament poc freqüent, que representa aproximadament el 7-10% de tots els limfomes no Hodgkin a Europa i Nord Amèrica. Afecta predominantment el sexe masculí (rao superior a 2/1) i la mitjana d'edat al diagnòstic és de 58 anys (amb un rang entre 22 i 78 anys).

1.4.2.2. Característiques clíniques

La majoria dels LCM es diagnostiquen en estadis avançats (III i IV), probablement per la seva tendència a afectar localitzacions extranodals (melsa, anell de Waldeyer...). Segons la revisió feta per Press i col. (1996) de 13 sèries de LCM que contenia 515 pacients, la presentació clínica d'aquesta entitat es caracteritza per la detecció d'adenopaties generalitzades (71-90% casos), afectació de la medul.la òssia (53-93% casos), expressió perifèrica en forma de limfocitosi (10-69% casos) i esplenomegàlia (35-81%). L'afectació hepàtica és menys freqüent (18-35%), així com la del tracte gastrointestinal (15-28%). Precisament, l'afectació intestinal en forma de lesions sobrealçades de la mucosa de l'intestí prim, anomenada poliposi limfomatoide, pot constituir el primer símptoma del procés. Sovint també es detecten símptomes B (35-55% casos) i valors de lactat deshidrogenasa (LDH) i de β_2 -microglobulina elevats (30-50% i 54% de casos respectivament). El curs clínic d'aquesta malaltia és força agressiu, amb possibilitat d'assolir remissions parcials, però fins a l'actualitat és una malaltia incurable. La mitjana de supervivència és d'uns tres anys (27% de supervivència als 5 anys), però amb recidives constants. Només un 8% de malalts sobreviuen 10 anys o més (Fisher, 1999; Serrano i col., 2000).

1.4.2.3. Característiques ontogèniques, histològiques, morfològiques i immunològiques

Fins a l'actualitat no existeix un consens total sobre la cèl.lula de la qual s'origina el LCM. Sembla que aquest limfoma podria derivar d'un subtipus de limfòcits pre-centre germinal localitzats als fol.licles primaris o bé a la zona del mantell dels fol.licles secundaris (Campo i col., 1999). La distribució topogràfica d'aquests limfòcits al voltant de centres germinals i el fet que fossin positius per fosfatasa alcalina havia suggerit que podia existir una relació entre aquest tumor i les anomenades "cèl.lules del mantell" o els centròcits (Nanba i col., 1977). Aquesta segona hipòtesi sembla perdre força, ja que els estudis immunològics, així com la infreqüent troballa o absència de mutacions somàtiques al gen de la cadena pesada de les immunoglobulines confirmarien el seu origen en cèl.lules pre-centre germinal, sense que aquests limfòcits hagin entrat en contacte amb l'antigen (Hummel i col., 1994; Jaffe i col., 1999). Tot i això, existeixen alguns LCM que presenten mutacions progressives (en curs) en els gens de les immunoglobulines, fet que indicaria que l'estimulació antigènica podria tenir importància en determinats casos. Aquests estudis moleculars indiquen que alguns tumors podrien originar-se d'algun subtipus de limfòcits B autoreactius (Du i col., 1997; Pittaluga i col., 1998).

En localització nodal o ganglionar, el LCM apareix com una proliferació limfoide difusa o vagament nodular que esborra l'arquitectura normal del gangli limfàtic. Habitualment es poden trobar àrees de transició entre els patrons nodular i difús, però en alguns casos, el patró nodular pot ser el predominant i podria donar lloc a confusions i al diagnòstic erroni de LCF (Fisher i col., 1995). El patró vagament nodular pot aparèixer per la infiltració dels centres germinals residuals o per l'expansió de les cèl.lules neoplàsiques en estructures que mimetitzen els fol.licles primaris (Weisenburger i col., 1982). El patró de zona del mantell es caracteritza per l'observació de cèl.lules neoplàsiques que ocupen unes zones del mantell molt esteses que envolten centres germinals despallats reactius al llarg del gangli limfàtic (Jaffe i col., 1999).

La infiltració de la medul.la òssia, independentment de l'afectació de sang perifèrica, apareix en un 53-93% dels pacients (Pittaluga i col., 1996). El patró

d'infiltració pot ser nodular, intersticial o paratrabecular, o bé una combinació d'aquests. L'afectació de sang perifèrica té lloc en un 10-69% dels casos, i així com l'afectació de medul·la òssia per si sola no sembla tenir un significat pronòstic, l'afectació de sang perifèrica, amb o sense increment del nombre de limfòcits, s'ha associat a una supervivència escurçada (Pittaluga i col., 1996).

Des del punt de vista morfològic, el LCM ha estat descrit com una neoplàsia de limfòcits B monomorfes, de mida mitjana i nucli irregular. Existeixen dues variants morfològiques de LCM: el LCM típic o clàssic i el LCM blàstic o blastoide.

1. LCM típic: aquesta variant es caracteritza per una proliferació de limfòcits B de mida petita o mitjana, amb citoplasma escàs, nucli irregular amb cromatina condensada distribuïda uniformement i nuclèols discrets. És estrany trobar cèl·lules de mida gran, amb citoplasma abundant i nuclèols prominents, i quan es troben, solen correspondre a centroblastes reactius dels centres germinals residuals envaïts per les cèl·lules neoplàsiques. Algunes vegades es poden trobar cèl·lules amb un citoplasma més abundant i pàl·lid que mimetitzen les cèl·lules B monocitoides (Swerdlow i col., 1996). En els casos que les esmentades cèl·lules es localitzen envoltant els centres germinals (fet que s'observa més habitualment a la melsa) és important establir el diagnòstic diferencial amb el LEZM/LELVC (Piris i col., 1998). En altres casos, el LCM pot presentar un predomini de limfòcits petits amb cromatina condensada i nucli arrodonit i escasses cèl·lules amb nucli irregular o indentat. Aquesta variant pot resultar difícil de distingir de la LLC-B/LLPe-B. De totes formes, a la LLC-B/LLPe-B es poden observar centres de proliferació (centres de creixement pseudofol·licular) i/o prolimfòcits o paraimmunoblastes aïllats, fenòmens que no es troben al LCM.

2. LCM blàstic: la variant blàstica del LCM es considera una forma més agressiva de la malaltia, i inclou un ampli espectre de variants morfològiques, des d'aquelles en les quals s'observen cèl·lules semblants als limfoblastes fins a d'altres que contenen cèl·lules més grans i pleomòrfiques. Aquestes formes es diferencien morfològicament del LCM típic però es consideren variants agressives del LCM pel fet que presenten el mateix immunofenotip, així com alteracions citogenètiques similars tals com les translocacions que afecten la

regió 11q13, el reordenament del gen *bcl-1* i la sobreexpressió de ciclina D1 (Lardelli i col., 1990; Bosch i col., 1994).

2.a. Variant blàstica amb cèl.lules “limfoblàstiques”: aquesta va ser la primera variant del LCM blàstic que es va descriure, caracteritzada per la presència d'una població monòtona de limfòcits de mida mitjana amb citoplasma escàs, nucli arrodonit amb cromatina dispersa i nuclèols discrets (Harris i col., 1994). Aquests casos poden semblar un limfoma limfoblàstic o una afectació nodal d'una leucèmia aguda mieloide. L'índex mitòtic sol ser molt elevat (>2-3 mitosis per camp de gran augment). També es poden observar histiòcits epitelioides dispersos i més rarament, es pot trobar un patró en cel estrellat amb histiòcits que contenen cossos apoptòtics.

2.b. Variant blàstica amb cèl.lules més grans i pleomòrfiques: els LCM que presenten aquesta morfologia a la classificació de Kiel varen ser designats com a “limfoma centrocític anaplàsic” o com a “limfoma centroblàstic de subtipus centrocitoide”. Aquestes variants contenen una població de limfòcits més heterogènia, amb cèl.lules grans amb nuclis clivellats ovoides o irregulars, cromatina lleugerament dispersada i nuclèols petits i individualitzats (Zoldan i col., 1996). De la mateixa manera que els altres casos de LCM blàstic, l'índex mitòtic és molt elevat. Aquests casos poden ser difícils de distingir del limfomes de cèl.lules grans, tot i que les característiques nuclears, el contorn clivellat, la dispersió de la cromatina i la discordància entre mida gran del nucli i nuclèols petits suggereixen l'origen de cèl.lula del mantell.

Com a patró immunofenotípic, el LCM expressa antígens típics de línia B madura, com són CD19, CD20, CD22 i CD79a. Les immunoglobulines de superfície s'expressen amb una intensitat de moderada a forta i és freqüent trobar coexpressió d'IgM i IgD. Per altra banda, i contràriament a altres SLPC-B com és el cas de la LLC-B, el LCM tendeix a expressar la cadena lleugera lambda, més que la kappa. Com a característica comuna amb la LLC-B, els LCM també expressen l'antígen CD5, característic dels limfòcits T. És habitual detectar expressió de CD43 i respecte CD23, en el LCM habitualment no s'expressa, en canvi, la majoria de LLC-B són CD23+. Val a dir que en alguns casos de LCM blàstics s'ha detectat positivitat per CD23 (Taula 5, p. 24). L'expressió de CD10 i *bcl-6*, marcadors característics dels LCF, és inexistent

(Zukerberg i col., 1993; Dorfman i Pinkus, 1994; Kumar i col., 1996; Swerdlow, 1999). La característica més important del LCM és la sobreexpressió de ciclina D1, conseqüència de la translocació del locus *bcl-1* amb el gen de la cadena pesada de les immunoglobulines (veure 1.4.2.4.). La detecció de sobreexpressió de ciclina D1 en material inclòs en parafina representa una dada molt important en el diagnòstic diferencial del LCM (Yang i col., 1994; Zukerberg i col., 1995; Ott i col., 1996) respecte altres limfomes i leucèmies. La ciclina D1 es detecta en gairebé tots els casos de LCM, ja siguin variant típica o blàstica, en canvi, l'expressió de ciclina D1 en altres SLPC-B és molt rara, però cal fer constar que es detecta alguns casos de mieloma múltiple (MM) (Vasef i col., 1997) i en <2% de LLC-B portadores de t(11;14) amb comportament clínic molt agressiu (Bosch i col., 1994; Yang i col., 1994). Respecte l'anàlisi de l'antigen de proliferació cel.lular Ki-67, els graus d'expressió detectats es correlacionen amb l'índex mitòtic i la fracció de fase S, i donen una idea de l'activitat proliferativa del tumor. En general, la intensitat d'expressió de Ki-67 en el LCM és baixa però en les variants blàstiques esdevé intensa (Jares i col., 1996).

1.4.2.4. Característiques citogenètiques

L'alteració citogenètica característica del LCM és la translocació t(11;14)(q13;q32), que per estudis de citogenètica convencional es detecta en un 65% dels casos (Weisenburger i col., 1987; Frizzera i col., 1991; Leroux i col., 1991, Vandenberghe i col., 1991). Aquesta alteració es troba present en gairebé el 100% dels casos de LCM utilitzant tècniques d'hibridació in situ sobre nuclis en interfase amb sondes de locus específic de dos colors per les regions 11q13 i 14q32 (Bigoni i col., 1996; Monteil i col., 1996) o bé tècniques d'hibridació in situ sobre fibres d'ADN (Vaandrager i col., 1996). La t(11;14) va ser descrita per primera vegada en les SLPC-B (Van den Berghe i col., 1979), però també ha estat descrita en el MM (Dewald i col., 1985). La descripció d'aquesta anomalia citogenètica en determinades entitats ha suscitat controvèrsia. Així, la t(11;14) ha estat observada en alguns casos de LLC-B atípica i agressiva, en determinats LELVC, en un 20-30% de LPC-B i en el 5% de MM (Raffeld i Jaffe, 1991; Brito-Babapulle i col., 1992). Respecte els casos de

LLC-B atípica, així com els casos de LELVC, en revisions posteriors dels diagnòstics s'ha detectat un possible error en la catalogació dels pacients, que en realitat serien LCM (Raffeld i Jaffe, 1991). Un exemple el trobem en l'afirmació de la presència de t(11;14) en el LELVC (Jadayel i col., 1994), estudi en el qual el diagnòstic s'havia basat només en l'estudi de sang perifèrica, sense tenir en compte l'anàlisi de la melsa. És de destacar que alguns casos de LCM poden presentar-se amb esplenomegàlia marcada i poden imitar les característiques dels LEZM/LELVC, fet que obliga a establir un diagnòstic diferencial de certesa. Alguns estudis més recents, amb casos ben classificats de LEZM, han desmentit la troballa de t(11;14) en aquesta entitat (Savilo i col., 1998). S'han descrit altres variants de la t(11;14)(q13;q32), com són la t(2;11)(q11;q13) i la t(11;22)(q13;q11) que representen el reordenament del locus bcl-1 amb els gens de les cadenes lleugeres kappa i lambda respectivament, per tant, també una sobreexpressió de l'ARNm i de la proteïna (Komatsu i col., 1994).

Les alteracions secundàries en els LCM han estat menys estudiades. Tal i com es descriu a les taules 13 i 14, no existeix una alteració específica sinó que s'han trobat implicats les regions/els cromosomes 1p, 1q, 2q, +3, 3p, 3q, -6, 6q, 8q, 9q, 10p, 11p, -13, 13q, 17q i -Y (Leroux i col., 1990; Brito-Babapulle i col., 1992; Johansson i col., 1995; Argatoff i col., 1997; Hernández i col., 1997a; Ott i col., 1997; Wlodarska i col., 1999). Les formes blàstiques més agressives del LCM s'han associat a la presència de cariotips tetraploides (36% en les variants blàstiques i 80% en les variants pleomòrfiques respecte 8% en les variants clàssiques) (Ott i col., 1997). En aquests pacients també és més freqüent trobar cariotips complexos (Taula 13 i 14).

Taula 13. Alteracions primàries i secundàries descrites en el LCM

Alteracions primàries	Alteracions secundàries
t(11;14)(q13;q32)	-Y, 1p (Leroux i col., 1991)
t(11;22)(q13;q11)	13q, 17p (Brito-Babapulle i col., 1992)
t(2;11)(q11;q13)	6q, -13 (Johansson i col., 1995)
	9q, 17p (Argatoff i col., 1997)
	2q, 1q, 1p, 8q (Hernández i col., 1997a)
	-Y, 6q, 1p (Ott i col., 1997)
	2q, +3, 3p, 3q, -6, 9q, 10p, 11p (Wlodarska i col., 1999)

Taula 14. Alteracions citogenètiques detectades en el LCM en les principals sèries publicades

Grup	N total	N amb metafases alterades	% alteracions citogenètiques	% t(11;14) en pacients alterats	Alteracions citogenètiques més freqüents
Leroux i col., 1991	11	11	100%	100%	t(11;14), -Y, 1p
Brito-Babapulle i col., 1992	3	3	100%	100%	t(11;14), 13q i 17p
Argatoff i col., 1997	31	18	58% (18/31)	77.8% (14/18)	t(11;14), 9q i 17p
Hernández i col., 1997	27	20	74% (20/27)	65% (13/20)	t(11;14), 2q, 1q, 1p i 8q
Ott i col., 1997	17	14	82.3% (14/17)	92.8% (13/14)	t(11;14), -Y, 6q i 1p
Wlodarska i col., 1999	74	43	58% (43/74)	83% (36/43)	t(11;14), 2q, +3, 3p, 3q, -6, 9q, 10p, 11p

1.4.2.5. Característiques gèniques

Els punts de trencament de la translocació t(11;14) varen ser clonats l'any 1988 per Tsujimoto i col. Aquest fet va permetre explicar que el resultat de l'esmentada alteració citogenètica col·locava la regió d'unió (regió J) del gen de la cadena pesada de les immunoglobulines, situada a 14q32, al costat d'una regió que es va anomenar bcl-1 (per *B-cell leukemia/lymphoma-1*) localitzada a 11q13 (Figura 6).

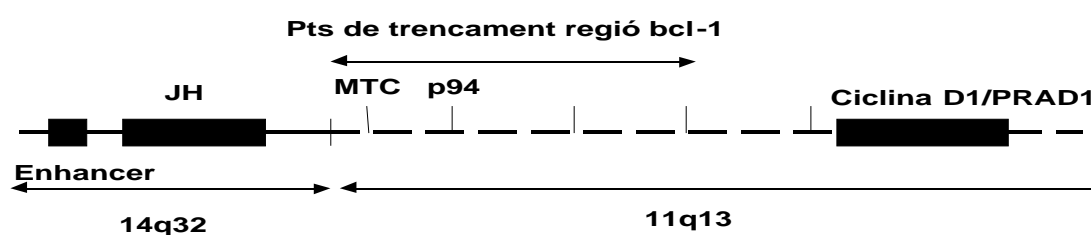


Figura6. Esquema de la translocació ciclina D1/IgH

La majoria de trencaments en el cromosoma 11 es localitzen en una regió que s'ha anomenat MTC (*major translocation cluster*) (30-55%), tot i que un 10-20% dels casos poden presentar-los en altres regions (Williams i col., 1993; Jaffe i col., 1999) (figura 5). Un cop van ser clonats els punts de trencament de la regió bcl-1, es va pensar que en aquella zona hi havia d'haver un gen putatiu que es desregularia en produir-se la translocació t(11;14). No va ser fins el 1991-1992 que es va clonar aquest gen. D'alguns estudis anteriors sobre la inversió inv(11)(p15q13) que es detecta en adenomes de paratiroide es va poder caracteritzar un nou gen, anomenat PRAD-1 (*parathyroid adenoma-1*) (Arnold i col., 1989). Aquest gen es va considerar com a candidat a ser activat en la t(11;14) que es produïa en el LCM (Seto i col., 1992).

Posteriorment, el gen va ser identificat per altres grups que seguien estratègies diferents (Motokura i col., 1991; Rosenberg i col., 1991; Withers i col., 1991), i es va demostrar que estava situat a unes 120 Kb més avall (*downstream*) del locus *bcl-1* descrit originàriament (Tsujimoto i col., 1984). L'anàlisi de la seqüència d'aquest gen va mostrar una gran homologia amb alguns gens de la família de les ciclines. Per aquesta raó, el gen va rebre el nom de ciclina D1 o CCDN1³. Com a resultat de la juxtaposició del locus *bcl-1* (11q13) a la seqüència promotora del gen de la cadena pesada de les immunoglobulines (14q32) té lloc una sobreexpressió de l'ARNm (Rosenberg i col., 1991; Rimok i col., 1993; Bosch i col., 1994; de Boer i col., 1995a) i de la proteïna (Yang i col., 1994; de Boer i col., 1995b; Swerdlow i col., 1995; Zukerberg i col., 1995). La ciclina D1 és un membre de la família de les ciclines G1, que tenen un paper important en la regulació del cicle cel·lular (Matsushime i col., 1991; Baldin i col., 1993; Lukas i col., 1994). Aquesta proteïna no s'expressa de forma normal a les cèl·lules de l'estirp limfoide ni mieloide, en canvi, al LCM s'expressa de manera constant, fet que indica un paper important en la patogènesi del limfoma. Es creu que la desregulació d'aquest gen altera la transició entre les fases G1 i S del cicle cel·lular, fet que contribuiria al desenvolupament tumoral. S'ha postulat que, probablement, la t(11;14) representa un canvi inicial en un procés degut a l'acumulació de múltiples canvis com és la tumorigènesi del LCM.

Les cèl·lules que sobreexpressen ciclina D1 presenten unes característiques proliferatives alterades, ja que tenen una fase G1 escurçada i depenen menys dels factors de creixement externs. Tot i això, tant en LCM com en altres tipus de tumors sòlids, la sobreexpressió de ciclina D1 tota sola té molt poca capacitat oncogènica i no es correlaciona amb l'activitat proliferativa del tumor, de manera que sembla que existirien altres elements reguladors que actuarien conjuntament amb ciclina D1 per a desregular el control del cicle cel·lular (Jares i col., 1996) (Figura 7). Aquests altres elements reguladors són encara poc coneguts. Les principals alteracions moleculars addicionals en els LCM es detallen tot seguit.

³ El gen afectat a la t(11;14) situat a 11q13 s'anomena indistintament ciclina D1, CCDN1 o PRAD-1. La proteïna se sol anomenar ciclina D1.

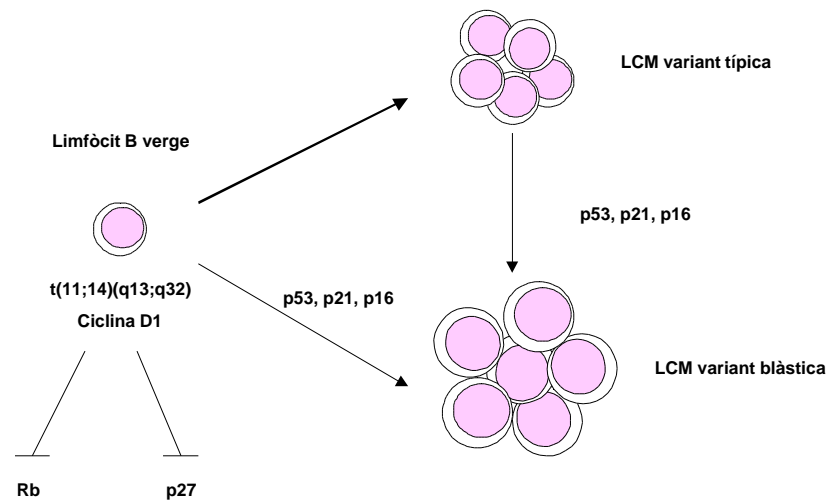


Figura 7. Patogènesi molecular del limfoma de cèl.lules del mantell i les seves variants (Campo i col., 1999)

1. Mutacions del gen TP53 i sobreexpressió de la proteïna

La proteïna p53, com s'ha esmentat anteriorment (veure 1.4.1.5), és una proteïna nuclear que té un paper important en la regulació del control del cicle cel.lular. L'anàlisi del gen TP53 per tècniques immunocitoquímiques, de SSCP i de seqüenciació ha permès detectar-ne mutacions, així com sobreexpressió de la proteïna (pel fet de tenir una vida mitja més llarga que la variant no mutada, tot i que pot no ser funcional, en els casos amb mutació de TP53 s'observa sobreexpressió proteica) en aproximadament un 40% de les formes histològicament agressives (blàstiques) del LCM, mentre que a les formes típiques es detecta amb molt poca freqüència. Les mutacions i sobreexpressió de TP53 s'han associat amb mal pronòstic en el LCM (Louie i col., 1995; Greiner i col., 1996; Hernández i col., 1996; Zoldan i col., 1996). El mecanisme pel qual les mutacions de TP53 condueixen a una activitat proliferativa més elevada i un comportament més agressiu en els LCM blàstics és poc conegut. En condicions normals, la proteïna p53 participa en el control de la progressió del cicle cel.lular, concretament en el punt de control de G1 que permet a la cèl.lula reparar el dany en l'ADN abans de duplicar el material genètic (Lane, 1992). Se sap que la proteïna p53 en el seu estat salvatge regula el complex de ciclina D1/CDK a través del gen p21 i que inhibeix l'efecte de ciclina D1. Quan p53 està mutada, aquest

efecte es perd i s'accentua l'efecte de promoció del creixement cel.lular propi de la ciclina (Greiner i col., 1996; Hernández i col., 1996).

2. Expressió del producte del gen retinoblastoma (pRb)

La pRb s'expressa en tots els LCM però els graus d'expressió varien en cada cas i s'ha vist que existeix una correlació entre l'expressió de pRb i l'activitat proliferativa del tumor (mesurada en forma d'índex mitòtic, fracció de fase S o expressió de Ki67). Alguns estudis han apuntat que la ciclina D1 participa en la regulació de la fase G1 a través de la seva interacció amb pRb, fet que sembla indicar que ambdues proteïnes estarien involucrades en la mateixa ruta de control del cycle cel.lular. La ciclina D1 s'uniria a pRb i gràcies a la unió d'aquest complexe a les quinases depenents de ciclins (CDKs), la pRb podria ser fosforilada, de manera que s'inactivaria la funció normal com a supressor de tumors de pRb (Jares i col., 1996). Per altra banda, també s'ha demostrat que la pRb funcional estimula la transcripció de ciclina D1 (Muller i col., 1994). Els resultats dels estudis realitzats demostren que la sobreexpressió de ciclina D1 constant en el LCM tindria un paper important en el manteniment de la proliferació cel.lular superant el control negatiu sobre el creixement exercit per pRb.

3. Pèrdua d'expressió o deleció dels inhibidors de quinases depenents de ciclins (CDKi)

El cycle cel.lular està regulat per una família de quinases depenents de ciclins (CDKs, *cyclin-dependent kinases*) (les més habituals són CDK4 i CDK6) i les subunitats reguladores de les ciclins. Els complexos ciclina/CDK s'activen i s'inactiven en punts específics del cycle cel.lular en resposta a requeriments interns i externs (Sherr, 1996). L'activitat fosforiladora de les CDKs pot ser inhibida per un grup d'inhibidors de les CDKs (CDKi, *cyclin-dependent kinase inhibitors*) que s'uneixen als complexos ciclina/CDK i impedeixen que el cycle cel.lular avanci. Principalment existeixen dos grups de CDKi, el grup de p15, p16 i p18, que inhibeixen específicament CDK4 i CDK6 i el grup de p21, p27 i p57, que es poden unir a un ampli ventall de complexos ciclina/CDK.

Els CDKi p21 i p16 s'han apuntat com a possibles candidats a gens supressors de tumors. L'estudi de l'expressió, mutació i deleció d'aquests CDKi ha permès detectar alteracions en les variants blàstiques del LCM. La pèrdua d'expressió i/o

deleció de p21 i p16 es detecta en un 67% de les formes blàstiques, mentre que no apareix a les formes típiques del limfoma. S'ha observat que la proteïna p53 en forma no mutada indueix l'expressió de p21, cosa que no succeeix quan p53 està mutada. Per altra banda, aquells casos que presenten p21 i p16 alterats (per manca d'expressió o deleció) sempre presenten p53 en forma no mutada i s'associen a variants agressives del LCM (Pinyol i col., 1997).

Respecte p27, aquesta proteïna és un CDKi present en grans quantitats a les cèl.lules en estat quiescent que desapareix quan les cèl.lules entren en cicle. El gen que codifica p27 també s'ha apuntat com a possible gen supressor de tumors, ja que inhibeix la proliferació cel.lular. En un estudi fet sobre 116 LNH, entre els quals hi havia 50 LCM (40 formes típiques i 10 formes blàstiques), en tots els tipus de LNH excepte els LCM l'expressió de p27 va ser inversament proporcional a l'índex de proliferació del tumor (mesurat per l'expressió de Ki67), fet que indica que p27 no està implicat el LCM com a factor tumorigènic. En canvi, en les formes típiques del LCM, un 88% dels casos varen ser negatius per l'expressió de p27, independentment de la taxa de proliferació; paradoxalment, en el 80% de les formes blàstiques es va detectar expressió de p27, tot i presentar una elevada taxa de proliferació. En cap cas, però, s'han detectat delecions ni mutacions gèniques de p27, per tant, això no podria explicar la manca d'expressió en els LCM típics. Probablement, la manca de correlació d'expressió de p27 amb la taxa de proliferació en els LCM típics deguda a la producció elevada de ciclina D1. Una possible explicació seria que la producció elevada de ciclina D1 indueixin la degradació de p27. Així, la pèrdua d'expressió de p27 actuaria com a potenciador de l'activitat oncogènica de la ciclina D1. En el cas dels LCM blàstics, el fet de detectar expressió de p27, tot i presentar uns alts graus de proliferació, es podria explicar per la presència d'altres factors alterats (mutacions i delecions en altres gens reguladors del cicle cel.lular com TP53, p16 i p21) que contribuirien al desenvolupament de formes més agressives amb una taxa proliferativa elevada, i permetrien un increment compensatori de p27 (Hernández i col., 1996; Pinyol i col., 1997; Quintanilla-Martínez i col., 1998).

4. Inactivació del gen ATM

Recentment s'ha determinat la importància del gen ATM, situat a 11q22-q23, en el desenvolupament tumorigènic del LCM. El gen ATM, com s'ha esmentat anteriorment (veure 1.4.1.5.), s'ha relacionat amb la LLC-B; es pensava que podria ser un gen supressor de tumors en aquesta malaltia, ja que apareixia sovint delecionat. La delecio de la regió 11q22-q23 també ha estat descrita en el LCM. Stilgenbauer i col. (1999), amb la intenció d'aïllar el gen supressor de tumors putatiu situat a 11q22-q23, varen caracteritzar la regió delecionada en una sèrie de 81 LCM utilitzant sondes de FISH de la regió clonades en un conjunt de YACs. Es va observar pèrdua de material de 11q22-q23 en el 46% dels LCM, i la regió comú que es perdia contenia el gen ATM. Schaffner i col. (2000) han estudiat paral·lelament la delecio del gen ATM i les possibles mutacions del segon al·lel, en una sèrie de 12 LCM amb la t(11;14)(q13;q32). El resultat ha estat que en més del 50% de casos s'ha trobat el primer al·lel delecionat i el segon mutat (donant lloc a una proteïna no funcional), o bé ambdós al·lells mutats. Pel que fa al gen ATM, es considera que en els LCM actua com a gen supressor de tumors i compleix la hipòtesi de Knudson (1971). En condicions normals, el gen ATM regula la resposta cel·lular als trencaments d'ADN com a part de la regulació de la progressió del cycle cel·lular, inducció de l'apoptosi i reparació de l'ADN. Si ATM no està actiu, hi ha un control defectiu del cycle cel·lular. Sembla que la inactivació d'ATM actuaria sinèrgicament amb la sobreexpressió de ciclina D1 en l'anul·lació de punts de control del cycle cel·lular, fet que afavoriria l'acumulació d'altres alteracions genètiques i el desenvolupament tumorigènic.

1.4.3. Limfoma esplènic de la zona marginal (LEZM)

1.4.3.1. Introducció i epidemiologia

El limfoma esplènic de la zona marginal (LEZM) és una entitat clínico-patològica que va ser inclosa com a categoria provisional en la classificació REAL, amb la denominació de LEZM amb o sense limfòcits vellosos circulants (Harris i col., 1994). En la recent classificació de l'OMS, aquesta entitat ha estat acceptada plenament com a categoria (Harris i col., 1999). El LEZM es caracteritza per l'aparició d'un infiltrat limfoide nodular de la polpa blanca de la melsa, centrat en

els fol·licles preexistents. La majoria de fol·licles desapareixen degut a la invasió per una població de limfòcits B petits a la zona central i d'altres de mida mitjana a la perifèria (Isaacson i Piris, 1997).

Ja el 1979, Neiman i col. varen descriure un grup de pacients afectes de limfoma esplènic associat a la presència d'unes cèl·lules a sang perifèrica que presentaven una morfologia semblant, però no idèntica, a la dels tricoleucòcits de la tricoleucèmia (Neiman i col., 1979). La histologia d'aquest limfoma era un infiltrat nodular centrat a la polpa blanca. Posteriorment, es varen publicar casos similars, caracteritzats per la presència d'un immunocitoma esplènic primari amb cèl·lules velloses circulants (Spriano i col., 1986). La caracterització dels aspectes hematològics (clínic, citològic, immunocitoquímic i citogenètic) d'aquesta entitat, que es va anomenar limfoma esplènic amb limfòcits vellosos circulants (LELVC), es va dur a terme pel grup de Catovsky i col., tot i que l'aspecte histològic va ser poc estudiat (Melo i col., 1987; Mulligan i col., 1991; Oscier i col., 1993; Matutes i col., 1994b). Respecte la part histològica, Schmid i col. varen publicar quatre casos de limfoma esplènic primari amb les mateixes característiques histològiques, immunohistoquímiques i genètiques, sense fer referència a la vessant hematològica (Schmid i col., 1992). El fet que les cèl·lules neoplàsiques fossin semblants a les cèl·lules de la zona marginal dels fol·licles limfoides de la melsa va fer que s'adoptés el nom de limfoma esplènic de la zona marginal (LEZM). Quan es van estudiar la histologia i immunohistoquímica de la melsa dels LELVC es va concloure que aquestes eren idèntiques a les dels LEZM. També es va fer evident que no tots els LEZM anaven acompanyats de cèl·lules neoplàsiques a sang perifèrica, i que quan apareixien, no sempre eren limfòcits vellosos (Isaacson i col., 1994). Per aquesta raó, el LEZM va ser inclòs com a entitat provisional a la classificació REAL com a "LEZM amb o sense limfòcits vellosos circulants" (Harris i col., 1994) i s'ha refermat en la seva condició d'entitat definitiva en la classificació de l'OMS (Harris i col., 1999).

El LEZM és un limfoma que suposa un 1-2% del total de SLPC-B amb expressió hemoperifèrica (LELVC), i un 25% del total de limfomes esplènics de baix grau (Serrano i cols., 2000). Afecta per igual homes i dones, i la mitjana d'edat al diagnòstic és superior als 50 anys (Isaacson, 1999).

1.4.3.2. Característiques clíniques

El signe més freqüent en el diagnòstic d'un LEZM és l'esplenomegàlia, que en alguns casos va acompanyada per troballes característiques associades a l'hiperesplenisme, com són l'anèmia hemolítica autoimmune i la trombocitopènia. És freqüent detectar una xifra absoluta de limfòcits circulants elevada, tot i que en un 24% dels pacients no la presenten, i en la majoria dels casos els limfòcits circulants es caracteritzen per presentar pèls curts situats a la superfície dels pols de la cèl.lula, tot i que poden no observar-se. Cal esmentar que no tots els casos presenten expressió hemoperifèrica, fet que apuntaria la melsa com a localització inicial de la malaltia. La medul.la òssia es veu afectada amb elevada freqüència, independentment de la presència o absència d'expressió perifèrica. Sovint es detecta l'afectació hepàtica si en el moment de l'esplenectomia (procediment habitual en aquests pacients com a mesura de tractament) es fa una biòpsia. La presència d'adenopaties és molt poc freqüent i, ocasionalment, es pot detectar una banda monoclonal en l'estudi de les proteïnes del sèrum (Melo i col., 1987; Isaacson i Piris, 1997; Isaacson, 1999; Serrano, 2000).

El curs clínic d'aquesta malaltia és indolent, amb una mitjana de supervivència als 5 anys del 78% (Mulligan i col., 1991) i sembla que no respon als tractaments quimioteràpics convencionals. L'esplenectomia és el tractament d'elecció, i tot i que s'assoleixen taxes de remissió perllongades, la malaltia tendeix a evolucionar posteriorment infiltrant la medul.la òssia (Isaacson i Piris, 1997).

1.4.3.3. Característiques ontogèniques, histològiques, morfològiques i immunològiques

La determinació de la cèl.lula a partir de la qual s'origina el LEZM ha estat molt discutida. En un principi, quan Schmid i col. (1992) varen descriure el limfoma esplènic primari, es va observar que les cèl.lules neoplàsiques eren molt semblants a les cèl.lules de la zona marginal dels ganglis esplènics, de manera que es va adoptar el nom de limfoma esplènic de la zona marginal. Isaacson i

col. (1994) varen confirmar aquesta denominació, argumentant que aquesta entitat apareixia com a limfoma primari de la melsa i presentava un patró de zona marginal. La morfologia i l'immunofenotip de les cèl.lules, com a mínim a la perifèria de l'infiltrat, eren molt similars als dels limfòcits B de la zona marginal dels ganglis esplènics. Tot i això, existeixen una sèrie d'arguments en contra de l'origen a partir de la cèl.lula B de la zona marginal. En primer lloc, les cèl.lules tumorals envolten i envaeixen els centres germinals sense preservar el mantell fol.licular, de manera que no es pot identificar clarament que les cèl.lules tumorals parteixin de la zona marginal, com si que passa en altres limfomes marginals. Per altra banda, les característiques citològiques del LEZM són "bifàsiques", de manera que només trobem cèl.lules similars a les de la zona marginal de la melsa a la perifèria dels nòduls de polpa blanca. El patró de "zona marginal" només s'observa en la melsa, no en ganglis limfàtics ni en altres situacions extraesplèniques. Finalment, la histologia i l'immunofenotip de les cèl.lules del LEZM difereixen lleugerament dels de les cèl.lules de la zona marginal normal (particularment respecte l'expressió d'IgD, que és positiva en LEZM i negativa en la zona marginal esplènica normal i també en els limfomes de la zona marginal no esplènics), i també dels d'altres limfomes de la zona marginal quan afecten la melsa. Per tots aquests motius, l'origen cel.lular del LEZM encara està en discussió (Isaacson i Piris, 1997; Isaacson, 1999) (Taula 15, p. 65).

La histologia del LEZM es caracteritza per una infiltració limfoide de la polpa blanca de la melsa. S'observen alguns centres fol.liculars reactius però la gran majoria queden reduïts a un nòdul hialinitzat o bé desapareixen parcialment o per complet degut a la invasió dels limfòcits neoplàsics, que com s'ha esmentat anteriorment són de dos tipus; els més petits i similars als limfòcits de la zona del mantell se situen al centre i els de mida mitjana, similars als limfòcits de la zona marginal, a la perifèria dels infiltrats. La polpa vermella de la melsa també es veu afectada: s'observen infiltrats difusos de cèl.lules petites i agregats micronodulars de cèl.lules més grans, amb invasió dels sinus. Els nòduls limfàtics de l'hil.li esplènica, i en ocasions els perifèrics s'hi poden veure involucrats. En aquests últims es pot apreciar una preservació i dilatació dels sinus i una infiltració centrada en els fol.licles, com té lloc a la melsa, però no apareix patró de zona

marginal. Sovint es pot observar també infiltració de la medulla òssia, de forma intersticial, nodular i no paratrabecular. Aquest patró també es pot observar en les biòpsies hepàtiques dels malalts afectats per aquest limfoma (Isaacson, 1999).

Des del punt de vista morfològic, el LEZM presenta una citologia “bifàsica” característica a la melsa, en la qual trobem dos tipus cel·lulars:

1. Els limfòcits B petits, semblants als de la zona del mantell fol·licular: els

limfòcits petits se situen a la zona central dels infiltrats i es caracteritzen per assemblar-se als limfòcits B petits que es troben a la zona del mantell fol·licular dels centres germinals normals. Són cèl·lules mida petita, amb citoplasma escàs, nucli irregular amb cromatina condensada distribuïda uniformement i nuclèols discrets. (Melo i col., 1987)

2. Els limfòcits B de mida mitjana, semblants als de la zona marginal del fol·licle

limfoide: aquests limfòcits es localitzen més cap a la perifèria dels infiltrats i es caracteritzen per presentar una quantitat moderada de citoplasma eosinofílic pàl·lid i un nucli amb un contorn lleugerament irregular.

A la zona més perifèrica es poden observar algunes cèl·lules blàstiques nucleolades distribuïdes entre la població de mida mitjana, en alguns casos amb signes evidents de diferenciació plasmacítica.

Quan el LEZM presenta expressió perifèrica, els tipus cel·lulars que s'hi poden trobar difereixen en algunes característiques morfològiques dels que es localitzen a la melsa. Com s'ha esmentat, i així es reflecteix en la nomenclatura d'aquest limfoma acceptada ja per la classificació de l'OMS (Harris i col., 1999), el LEZM es pot presentar amb o sense expressió hemoperifèrica i en cas que aquest fet tingui lloc, els limfòcits circulants que s'hi troben poden ser molt heterogenis, entre els quals destaquen limfòcits vellosos, cèl·lules d'aspecte centrocític, d'altres amb clara diferenciació plasmocitoide amb microvellositats i limfòcits B monocitoides.

Els limfòcits vellosos tenen una mida lleugerament superior a la dels limfòcits normals però inferior a la del tricoleucòcit de la tricoleucèmia. El nucli es caracteritza per presentar una cromatina força condensada i un perfil arrodonit o ovalat. Normalment s'observa un nuclèol molt petit i poc aparent a nivell òptic i de vegades el nucli tendeix a l'excentricitat. El citoplasma és menys abundant

que en el tricoleucòcit i és força basòfil. Els pèls són curts, amb una base d'implantació estreta i sovint es disposen en els dos pols de la cèl.lula, o bé en un sol pol (en aquest últim cas s'ha de distingir de l'uròpode propi de la cèl.lula T). Aquests limfòcits poden anar acompanyats d'algun limfoplasmòcit i/o cèl.lula plasmàtica.

Els limfòcits B monocitoides són limfòcits de mida més gran, amb un citoplasma ampli clar o de característiques més o menys basòfiles. El perfil del nucli és irregular, semblant al del monòcit, raó per la qual s'anomenen limfòcits monocitoides. La cromatina és mitjanament condensada i el nuclèol és poc aparent, tot i que de vegades es troben alguns nuclis d'aspecte blàstic. Aquestes cèl.lules també poden presentar prolongacions citoplasmàtiques digitiformes, que fan necessari el diagnòstic diferencial amb els tricoleucòcits (Woessner i Florensa, 2000).

Com a patró immunohistoquímic, les cèl.lules neoplàsiques a la melsa expressen marcadors típics de línia B madura, com són CD19, CD20, CD22 i CD79a. A diferència de la LLC-B i el LCM, el LEZM no sol expressar CD5 ni tampoc CD43 (antígens associats a limfòcits T). És característica l'expressió d'IgM i IgD, i també de restricció de cadenes lleugeres. El LEZM no expressa CD23 ni CD10. En aquells casos amb diferenciació plasmacítica, alguna subpoblació cel.lular pot presentar una concentració més elevada d'immunoglobulines citoplasmàtiques. Entre l'infiltrat de la polpa blanca és freqüent trobar limfòcits T CD3+ i cèl.lules dendrítiques fol·liculars CD21+. Finalment, l'expressió de CD21 i CD35, marcadors característics de les cèl.lules de la zona marginal esplènica normal, és variable, i pot ser positiva o negativa. L'expressió de bcl-2, així com de ciclina D1 és inexistent. A la taula 15 es poden comparar les característiques immunofenotípiques del LEZM, del limfoma de la zona marginal (LZM) i de les cèl.lules de la zona marginal normal (CZMN).

Respecte la detecció de l'antígen de proliferació cel.lular Ki-67, s'observa un patró de tinció característic, amb una fracció altament proliferant situada a la zona "marginal" perifèrica i en algun centre germinal residual. En els ganglis limfàtics de l'hilum esplènic, la tinció dona un patró semblant, sense una "zona marginal" identificable (Isaacson i Piris, 1997; Isaacson, 1999).

Taula 15. Característiques immunofenotípiques del LEZM, del limfoma de la zona marginal (LZM) i de les cèl.lules de la zona marginal normal (CZMN) (Isaacson, 1999)

Característiques immunològiques	LEZM	CZMN	LZM
Ig	M+, D+	M+, D-	M+, D-
CD20	+	+	+
CD10	-	-	-
CD5	-	-	-
CD23	-	-	-
CD21	+/-	+	+
CD35	+/-	+	+
CD43	-	-	+/-
Ciclina D1	-	-	-

En els estudis immunocitoquímics realitzats sobre limfòcits vellosos circulants de casos catalogats com a LELVC (Matutes i col., 1994b), el fenotip és més variable, amb possible expressió de CD5 i de CD10 en determinats casos. Les diferències entre els resultats immunohistoquímics (referits als casos de LEZM) i immunocitoquímics (referits als casos de LELVC) poden explicar-se en part per la diferència de tècniques, però sobretot per la possibilitat que entre els casos de LELVC s'hi hagin inclòs altres tipus de limfomes amb presentació esplenomegàlica i expressió hemoperifèrica (Isaacson i Piris, 1997).

1.4.3.4. Característiques citogenètiques i gèniques

Fins a l'actualitat, existeixen poques sèries que descriguin les alteracions citogenètiques característiques dels LEZM; per aquesta raó, els coneixements que es tenen respecte el tema són limitats.

La incidència global d'alteracions cromosòmiques clonals se situa entre un 70 i un 87% (Oscier i col., 1993; Dierlamm i col., 1996b). Els primers estudis es varen

realitzar en casos descrits com a LELVC, tenint en compte només el component perifèric, però sense un estudi exhaustiu de la histologia de la melsa. En la sèrie d'Oscier i cols. (1993), les alteracions citogenètiques que es varen trobar varen ser la **t(11;14)(q13;q32)**, l'afectació de 7q en forma de translocació o deleció, la presència d'isocromosoma i(17)(q10) i translocacions a 2p11. L'associació amb el LCM que va ser postulada per Oscier i col. (1993) i també per Troussard i col. (1998) no ha estat confirmada per altres grups, i en els casos diagnosticats de LEZM tenint en compte la histologia esplènica, la translocació t(11;14) ha estat sempre absent. Probablement, els casos en què es va trobar l'esmentada translocació han estat confosos amb LELVC, però en realitat eren LCM leucemitzats amb afectació esplènica. Respecte la **trisomia 3**, aquesta alteració ha estat associada als limfomes marginals, ja siguin extranodals (LMALT), nodals (LZMN) o esplènics (LEZM) (Wotherspoon i col., 1995; Brynes i col., 1996; Dierlamm i col., 1996b). En els LEZM s'han descrit incidències de trisomia 3 d'entre el 18 i el 54%. Actualment s'està discutint si les incidències d'aquesta trisomia permeten separar els LEZM d'altres limfomes marginals, en els quals les incidències de trisomia 3 es troben entre el 60 i el 85% (Wotherspoon i col., 1995; Brynes i col., 1996; Gruszka-Westwood i col., 1999). Una altra alteració citogenètica que ha estat associada al LEZM ha estat la **deleció del(7q)**. La presència de la deleció de 7q (7q22 i 7q32) en les SLPC-B de cèl.lules madures, entre elles els LELVC, ja va ser descrita el 1993 pel nostre grup (Solé i col., 1993). Posteriorment, altres estudis han confirmat la presència de l'esmentada alteració en aproximadament un 40% dels LEZM (Mateo i col., 1999). Altres alteracions descrites en aquesta patologia han estat diverses translocacions que afecten la banda **14q32**, on es localitza el gen de la cadena pesada de les immunoglobulines, com té lloc en altres tipus de SLPC-B.

Els estudis genètics han descrit la presència de reordenaments monoclonals (és a dir, es confirma la natura clonal de la malaltia) i també d'hipermutacions somàtiques del gen de la cadena pesada de les immunoglobulines (Zhu i col., 1995). Aquest fet indica que la cèl.lula afecta ha entrat en contacte amb l'antígen, de manera que indicaria un origen post-centre germinal d'aquesta entitat.

Taula 16. Alteracions citogenètiques detectades en les principals sèries de LEZM/LELVC

Grup	N total	N amb metafases alterades	% alteracions citogenètiques	%+3/+3q*	% del(7q)*	Altres alteracions citogenètiques
Oscier i col., 1993	31	27	87% (27/31)	0%	26%	t(11;14)(q13;q32), i(17)(q10), t(2p11)
Wotherspoon i col., 1995**	11	-	-	27%	-	+12, +18
Brynes i col., 1996**	11	-	-	18%	-	+7, +12
Dierlamm i col., 1996b	10	7	70% (7/10)	86%	-	+18, 1q21, 1q34
Troussard i col., 1998	44	19	43% (19/44)	26%	-	t(11;14)(q13;q32), 17p, +12

*Percentatges respecte els casos amb cariotip alterat; **Estudi realitzat per FISH, no citogenètica convencional

1.5. OBJECTIUS

Els objectius d'aquesta tesi són els següents:

1. Posar a punt la tècnica d'hibridació in situ fluorescent.
2. Estudiar paral·lelament tres grups de pacients, afectes de leucèmia limfàtica crònica B atípica (LLCa), limfoma de cèl·lules del mantell (LCM) i limfoma esplènic de la zona marginal (LEZM), amb les tècniques de citogenètica convencional i d'hibridació in situ.
3. Confirmar l'existència d'anomalies citogenètiques prèviament descrites a la literatura i determinar l'existència de noves alteracions cromosòmiques recurrents específiques de cada grup que permetin separar-los millor.
4. Determinar l'interès pràctic de l'aplicació de les tècniques de citogenètica convencional i hibridació in situ en el diagnòstic, pronòstic, tractament i seguiment de les diferents entitats clíniques estudiades.

2. MATERIAL I MÈTODES

2.1. PACIENTS

En aquest treball s'han estudiat mostres de diferents tipus de teixits biològics dels següents grups de malalts:

- 28 malalts afectes de leucèmia limfàtica crònica B atípica (articles 1 i 2)
- 13 malalts afectes de limfoma de cèl.lules del mantell (article 3)
- 19 malalts afectes de limfoma esplènic de la zona marginal (article 4)
- 1 malalt afecte de limfocitosi B policlonal persistent (article 5)

Les mostres han estat recollides entre els anys 1989 i 1998 i provenen de l'Hospital de la Creu Roja, l'Hospital Central l'Aliança, l'Hospital de l'Esperança, l'Hospital del Mar i l'Hospital Clínic de Barcelona.

2.2. MÈTODES

2.2.1. TÈCNIQUES DE CITOGENÈTICA CONVENCIONAL

2.2.1.1. Extracció i conservació de les mostres

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

A. Mostres de sang perifèrica

L'extracció de sang perifèrica es fa a partir de la vena basilíca o mitjana cefàlica del braç. S'extreuen de 2 a 5 mL de sang perifèrica en condicions.

La sang es recull en un tub amb 1% d'anticoagulant tipus heparina sòdica o heparina de liti, però mai amb EDTA ja que aquest inhibeix el creixement cel.lular.

La mostra de sang perifèrica es conservarà a 2-4°C (nevera) fins el moment de posar a créixer el cultiu. Es recomana procedir a cultivar tan aviat com sigui possible des del moment de l'extracció, però en cas que no sigui possible, la mostra pot aguantar bé 2-3 dies a la nevera.

B. Mostres de medul·la òssia

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

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

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

C. Mostres de gangli limfàtic

L'extracció del gangli limfàtic es realitza per un mètode quirúrgic dut a terme per un cirurgià mitjançant cirurgia menor.

La peça es recull de quiròfan en una gasa estèril i en sec es porta al laboratori d'Anatomia Patològica. Allà serà seccionada amb un bisturí estèril i una part anirà cap al laboratori de Citogenètica.

El fragment de gangli es conserva a T^a ambient en sec, però és recomanable processar-lo tot seguit a l'extracció o en un temps prou breu, ja que l'eficiència del cultiu disminueix a mida que el temps després de l'extracció de la peça augmenta.

D. Mostres de líquid pleural

Per a realitzar l'extracció del líquid pleural, prèviament a la punció s'administra anestèsia local. Posteriorment s'introdueix una agulla tocant el marge superior de la costella més propera a la zona de punció, i un cop dins la cavitat pleural, s'aspiren 20 mL de líquid.

La mostra de líquid pleural s'ha de posar a cultivar tan aviat com sigui possible després de la seva extracció per obtenir el màxim de cèl.lules en divisió. En cas que la mostra s'hagi de transportar o guardar unes hores abans de cultivar, és recomanable fer-ho a T^a ambient o bé a 37°C un màxim de 10 hores.

2.2.1.2. Composició del medi de cultiu

El medi de cultiu es prepara en una campana de fluxe laminar prèviament esterilitzada. A una ampolla de 100 mL de medi de cultiu RPMI-1640, s'afegeix 1 mL d'heparina sòdica o de liti (1%). Es treuen 20 mL de la barreja (s'utilitzaran, alíquotats en tubs de plàstic estèril amb 5 mL, per a recollida de mostres de medul.la òssia). Als 80 mL de medi restants s'afegeixen: 17 mL de sèrum boví fetal (17%), 2 mL de L-Glutamina (2%) i 1 mL de Penicil.lina-Estreptomicina (1%). S'aliquoten els 100 mL de medi complet en flascons de cultiu de plàstic estèril de 25 cc, amb 10 mL a cada flascó. Es conserven a -20°C fins el moment del seu ús.

2.2.1.3. Tècniques de processat dels diferents teixits

2.2.1.3.1. Tècnica de citogenètica convencional en cultius de sang perifèrica

A. Manipulació del medi de cultiu i de la mostra abans de procedir al cultiu

-Descongelar un flascó amb medi complet (RPMI 1640, Sèrum boví fetal, L-Glutamina, Penicil.lina-Estreptomicina, Heparina), a T^a ambient o al bany maria a 37°C.

-Afegir la quantitat necessària de mitògen. Cal esmentar que per estimular la divisió dels limfòcits B s'han utilitzat diferents tipus de mitògens ja que no n'hi ha cap d'específic. En el present treball s'han utilitzat diferents tipus de mitògens a les següents concentracions finals:

- .Fitohemaglutinina (PHA) al 5%
- .Acetat de miristat de tetraforbol (TPA), 0.1µg/mL
- .Pokeweed mitogen (PWM) al 0.25%
- .Lipopolisacàrid d'Escherichia coli (LPS), 25µg/mL
- .Dextran sulfat (DXS) , 0.1µg/mL

Cal esmentar que, després d'haver testat un nombre prou elevat de mostres procedents de pacients afectes de diversos tipus de síndromes limfoproliferatives B al nostre laboratori (no tansols les que es reflecteixen en aquest treball), s'ha arribat a la conclusió que el millor mitògen per estimular els limfòcits B és el TPA. Així doncs, en la resta de teixits, esmentaré tansols aquest mitògen com a reactiu d'ús recomanat.

-Afegir-hi la mostra de sang perifèrica. La quantitat de mostra a afegir està en funció del nº total de leucòcits de la mostra. És ideal ajustar el cultiu a 2×10^6 cèl/mL, per tant, caldrà procedir a fer un recompte del nº de leucòcits amb un comptador automàtic o amb una càmera de Neubauer. Un cop s'hagi obtingut la xifra de leucòcits es calcularà el volum de sang necessari per cultiu de forma que la concentració quedi ajustada a 2×10^6 cèl/mL.

B. Cultiu

-Obrir una mica el tap del flascó i col.locar-lo a l'estufa de cultiu a 37°C i 5% CO₂. Cultivar durant 72 hores (si la mostra arriba un dimecres o un dijous, pot arribar a estar de 96 a 120 hores a l'estufa), i barrejar el cultiu per inversió una vegada cada dia.

C. Processat de la mostra

- Dues hores abans d'iniciar el processat de la mostra, cal afegir 100 µl de Colcemid (antimitòtic) al flascó i deixar-lo actuar dins de l'estufa, a 37°C.
- Abocar el contingut del flascó a un tub de plàstic estèril per procedir amb el procés d'extracció del cultiu.
- Centrifugar la mostra durant 7-8 min. a 1500 rpm.
- Descartar el sobrenedant (vigilant perquè el sediment cel.lular pot quedar poc enganxat i es pot perdre), i resuspendre el sediment cel.lular.
- Afegir solució hipotònica de KCl (0.075 M) preescalfada a 37°C al tub amb el sediment cel.lular. Aquesta solució s'afegeix gota a gota i agitant fins els 2 primers mil.lilitres i després a raig fins a 8-10 mL.
- Col.locar el tub al bany maria a 37°C durant 30 minuts.
- Centrifugar 7-8 min. a 1500 rpm.
- Descartar el sobrenedant i resuspendre el sediment cel.lular. Afegir fixador Carnoy (3 parts de metanol i 1 part d'àcid acètic), primer gota a gota i agitant fins a 1-2 mL i després a raig fins a 8-10 mL*.
- Centrifugar 7-8 min. a 1500 rpm.
- Repetir el procés de fixació (assenyalat anteriorment amb el símbol*) de 3 a 5 vegades fins que el sobrenedant sigui transparent i el sediment cel.lular blanc.
- Fer extensions, 4-6 de cada tub. Assecar les extensions a la planxa a 50°C, i envellir-les a la planxa a 100°C durant 1 hora.

2.2.1.3.2. Tècnica de citogenètica convencional en cultius de medul.la òssia

A. Manipulació del medi de cultiu i de la mostra abans de procedir al cultiu

- Descongelar un flascó amb medi complet (RPMI 1640, Sèrum boví fetal, L-Glutamina, Penicilina-Estreptomicina, Heparina), a T^a ambient o al bany maria a 37°C.
- Centrifugar la mostra de medul.la òssia durant 8 minuts a 1500 rpm. Un cop centrifugada, es procedeix a extreure la capa blanca (rica en cèl.lules mononucleades, entre les quals hi ha els limfòcits que ens interessa estudiar)

amb una pipeta Pasteur estèril. Depenent de la cel.lularitat de la mostra es posaran de 0.3 a 0.8 mL de la capa blanca per ajustar el cultiu a 2×10^6 cèl./mL.

-Depenent del tipus de cèl.lules que predominin en la medul.la òssia (observades en les extensions procedents de l'aspirat medul.lar) s'afegirà o no mitògen al cultiu:

.Si predominen les cèl.lules immadures: sense mitògen

.Si predominen les cèl.lules madures: amb mitògen. Afegir 0.1 mL de TPA.

B. Cultiu

-Obrir una mica el tap del flascó i col.locar-lo a l'estufa de cultiu a 37°C i 5% CO₂.

-El temps de cultiu dependrà del tipus de cèl.lules que predominin a la suspensió cel.lular:

.Si en la medul.la òssia predominen les cèl.lules immadures: 24 hores de cultiu

.Si en la medul.la òssia predominen les cèl.lules madures: com a mínim, 72 hores de cultiu (en cas de coincidir amb el cap de setmana es pot allargar a 96 o 120 hores)

-Remenar el cultiu per inversió una vegada cada dia.

C. Processat de la mostra

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

2.2.1.3.3. Tècnica de citogenètica convencional en cultius de gangli limfàtic

A. Obtenció d'una suspensió cel.lular a partir de la peça de gangli limfàtic

Prèviament al cultiu de gangli limfàtic cal processar la mostra (peça de teixit sòlid) per tal d'obtenir una suspensió cel.lular que sigui possible posar a cultivar.

-Abans d'iniciar el procés d'obtenció de cèl.lules aïllades, es talla la peça de gangli i una part (d'una mida aproximada de 1,5 x 1,5 x 0,5 cm) s'utilitza per a fer emprentes sobre un portaobjectes. Això ens permetrà, un cop realitzada una

tinció de May-Grünwald Giemsa, observar la morfologia de les cèl.lules obtingudes i orientar el tipus de cultiu a realitzar.

-L'altra part de la peça s'utilitzarà per a l'obtenció de la suspensió cel.lular. Sobre una càpsula de petri estèril amb 5 mL de medi RPMI-1640 amb heparina sòdica a l'1% es col.loca la peça. Amb unes pinces o agulla estèrils es manté ferm el fragment de gangli amb una mà. Amb l'altra mà es procedirà a punxar el gangli amb una agulla i xeringa de 5 mL estèrils. En una primera etapa es procedeix a punxar la peça repetides vegades i posteriorment es procedeix a aspirar el medi de cultiu i a injectar-lo dins la peça. Aquest procés es repetirà moltes vegades, de manera que les cèl.lules que hi ha a l'interior del gangli limfàtic aniran sortint pels forats que hem practicat a la superfície de la peça. S'ha d'observar que el medi de cultiu va adoptant un aspecte cada vegada més tèrbol, indicatiu de la presència de cel.lularitat. El procés d'injecció de medi dins la peça s'atura quan aquesta ha quedat molt desfeta o bé quan la suspensió cel.lular és prou rica en cèl.lules per a posar el cultiu de citogenètica (dependrà de la mostra).

-La suspensió cel.lular es recull amb una pipeta Pasteur estèril i es col.loca en un tub de plàstic de 10 mL estèril.

-Centrifugar la mostra durant 7-8 min. a 1500 rpm.

-Descartar el sobrenedant i resuspendre el sediment cel.lular.

-Procedir a fer un comptatge cel.lular amb un comptador automàtic o amb càmera de Neubauer.

B. Manipulació del medi de cultiu i de la mostra abans de procedir al cultiu

-Descongela un flascó amb medi complert (RPMI 1640, Sèrum boví fetal, L-Glutamina, Penicilina-Estreptomicina, Heparina), a T^a ambient o al bany maria a 37°C.

-Depenent del tipus de cèl.lules que predominin en el gangli (observades en la imponenta) s'afegirà o no mitògen al cultiu:

.Si en el gangli predominen les cèl.lules immadures: sense mitògen.

.Si en el gangli predominen les cèl.lules madures: amb mitògen. Afegir 0.1 mL de TPA.

-Afegir-hi la mostra de gangli limfàtic. La quantitat de mostra a afegir està en funció del nº total de cèl.lules. És ideal ajustar el cultiu a 2×10^6 cèl/mL, per tant, caldrà calcular el volum de suspensió cel.lular necessària per obtenir la concentració prèviament esmentada.

C. Cultiu

-Obrir una mica el tap del flascó i col.locar-lo a l'estufa de cultiu a 37°C i 5% CO₂.

-El temps de cultiu dependrà del tipus de cèl.lules que predominin a la suspensió cel.lular:

. Si en el gangli predominen les cèl.lules immadures: 24 hores de cultiu

. Si en el gangli predominen les cèl.lules madures: 72 hores de cultiu

-Remenar el cultiu per inversió una vegada cada dia.

D. Processat de la mostra

El processat de la mostra és el mateix que per sang perifèrica (veure apartat 2.2.1.3.1).

2.2.1.3.4. Tècnica de citogenètica convencional en cultius de líquid pleural

A. Manipulació del medi de cultiu i de la mostra abans de procedir al cultiu

-Descongelar un flascó amb medi complet (RPMI 1640, Sèrum boví fetal, L-Glutamina, Penicilina-Estreptomicina, Heparina), a T^a ambient o al bany maria a 37°C.

-Centrifugar la mostra de líquid pleural durant 8 minuts a 1500 rpm. Un cop centrifugada, es descarta el sobrenedant i es resuspen amb 1-2 mL de medi RPMI-1640 amb heparina i es procedeix a fer un comptatge de les cèl.lules amb comptador automàtic o bé amb càmera de Neubauer. Depenent de la cel.lularitat de la mostra s'afegiran els mL necessaris de suspensió per ajustar el cultiu a 2×10^6 cèl/mL.

-Depenent del tipus de cèl.lules que predominin en el líquid pleural (observades en les extensions procedents citocentrifugació de la mostra) s'afegirà o no mitògen al cultiu:

.Si predominen les cèl.lules immadures: sense mitògen

.Si predominen les cèl.lules madures: amb mitògen. Afegir 0.1 mL de TPA.

-Afegir-hi la mostra de líquid pleural.

B. Cultiu

-Obrir una mica el tap del flascó i col.locar-lo a l'estufa de cultiu a 37°C i 5% CO₂.

-El temps de cultiu dependrà del tipus de cèl.lules que predominin a la suspensió cel.lular:

. Si en el líquid pleural predominen les cèl.lules immadures: 24 hores de cultiu

. Si en el líquid pleural predominen les cèl.lules immadures: 72 hores de cultiu

C. Processat de la mostra

El processat de la mostra és el mateix que per sang perifèrica (veure apartat 2.2.1.3.1).

2.2.1.4. Tècniques de bandes

Les preparacions obtingudes s'analitzen seguint la tècnica de bandes G amb tampó de Sørensen i colorant de Wright. En aquest cas, es tenyeixen les preparacions amb una solució composta per 3 parts de tampó de Sørensen i 1 part de colorant de Wright (veure apartat 2.3.2) durant 2-6 minuts (dependrà de si el colorant és acabat de fer o és vell), s'esbandeixen amb aigua de l'aixeta i s'assequen amb un paper de filtre.

2.2.1.5. Anàlisi microscòpica i nomenclatura de citogenètica convencional

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

Les anomalies cromosòmiques s'han descrit seguint la nomenclatura ISCN 1995. Es considera que una alteració cromosòmica és clonal quan la mateixa alteració estructural o guany d'un cromosoma es troba com a mínim en dues metafases o, en cas de ser una pèrdua d'un cromosoma, es troba com a mínim en tres metafases.

2.2.2. TÈCNiques D'HIBRIDACIÓ IN SITU (HIS)

2.2.2.1. Tipus de mostres

Les mostres per a la realització de les diverses tècniques d'hibridació in situ (HIS) procedien de mostres de citogenètica convencional. Aquestes mostres havien estat emmagatzemades amb solució fixadora de Carnoy (3 parts de metanol i 1 part d'àcid acètic) a una temperatura de -20°C a -80°C . El període d'emmagatzematge de les mostres abans de realitzar la tècnica d'HIS va ser variable, des de pocs dies fins a 5-6 anys.

2.2.2.2. Metodologia d'hibridació in situ

Al llarg del període de temps en el qual s'ha realitzat aquest treball d'investigació, les tècniques d'HIS han evolucionat considerablement, de manera que:

- En una primera etapa es va utilitzar una tècnica d'HIS amb marcatge indirecte de les sondes amb biotina i detecció immunoenzimàtica amb la reacció de la peroxidasa. Aquesta tècnica es va aplicar a totes les mostres procedents de pacients afectes de LCM (article 3) i de LEZM (article 4) analitzades amb sondes de pintat cromosòmic de diferents cromosomes

(Cambio). També fou aplicada a una part de les mostres de LLC-B atípiques (article 1) i a totes les mostres de LEZM (article 4) analitzades amb la sonda centromèrica del cromosoma 12 (Oncor).

- En una segona etapa es va utilitzar una tècnica de HIS amb marcatge directe de les sondes amb fluorescència. A aquesta tècnica se l'anomena FISH, de l'anglès *Fluorescence in situ hybridization*. Cal esmentar que s'han utilitzat sondes de FISH marcades amb dos tipus de fluorocroms, *Spectrum Green* (color verd) i *Spectrum Orange* (vermell) (Vysis). Aquesta metodologia s'ha aplicat a la part restant de LLCa amb la sonda del cromosoma 12 (CEP 12) i a totes elles amb les sondes de locus específic LSI 13q14 i LSI p53 (article 1). En el cas de la LLCa amb dic(17;18) (article 2) s'han aplicat les sondes centromèriques dels cromosomes 17 (CEP 17) i 18 (CEP 18) i la sonda de locus específic LSI p53. També s'ha aplicat a totes les mostres de LEZM (article 4) i a la mostra de LBPP (article 5) analitzades amb la sonda centromèrica del cromosoma 3 (CEP 3).

Els protocols per les esmentades tècniques es detallen a continuació.

2.2.2.2.1. Protocol d'HIS amb marcatge indirecte de les sondes amb biotina i detecció immunoenzimàtica amb la reacció de la peroxidasa. Sondes centromèriques i de pintat cromosòmic

A. Pretractaments de les mostres

-Tractament amb RNAsa

El tractament amb RNAsa té la funció d'eliminar l'ARN que pugui interferir en la reacció d'hibridació. Per això, es cobreixen les preparacions amb una solució de RNAsa A a 100 µg/mL en 2×SSC pH7 (200 µL per portaobjectes). Les preparacions es cobreixen amb un cobreobjectes i s'incuben en cambra humida a 37°C durant una hora. Posteriorment es renten les preparacions en tres banys de 2xSSC durant 5 minuts a temperatura ambient i en un quart bany de 2xSSC durant 5 minuts a 37°C.

-Tractament amb Pepsina

El tractament amb pepsina té la funció d'eliminar la membrana cel·lular i facilitar l'accés de la sonda a l'ADN diana. També s'ha proposat que aquest enzim podria hidrolitzar parcialment la seqüència de l'ADN i permetre així un millor accés de la sonda. Tot seguit, es submergeixen en un bany de pepsina 0.1 mg/mL en HCl 0.01 N a 37°C durant 5 minuts. A continuació, s'esbandeixen en una solució de 1xPBS a temperatura ambient durant 5 minuts.

-Fixació amb Formaldehid

La fixació amb formaldehid té la funció de mantenir al màxim l'estructura cromosòmica de l'ADN. Les preparacions es col·loquen en un bany de formaldehid a l'1% i 50 mM de $MgCl_2$ en un tampó de PBS durant 10 minuts a temperatura ambient. Les preparacions s'esbandeixen en una solució de 1xPBS a temperatura ambient durant 5 minuts. Les preparacions es deshidraten en una sèrie de banys d'etanol a 70, 90 i 100%, 5 minuts a cada bany, i es deixen eixugar a l'aire durant un mínim de 30 minuts.

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

La desnaturalització de l'ADN és el procés pel qual la doble hèlix d'àcid nucleic se separa en dues cadenes senzilles. Aquest procés s'aplica tant a l'ADN de la mostra com a l'ADN de la sonda (en cas que aquesta estigui formada per ADN de cadena doble) per tal que la hibridació entre ells sigui possible.

El mètode més utilitzat per a desnaturalitzar l'ADN és el tractament tèrmic (per cada cas cal establir el temps i la temperatura adequats). En aquest mètode s'utilitza la formamida, un dissolvent orgànic que disminueix la constant dielèctrica de la solució de desnaturalització i redueix l'estabilitat tèrmica de la doble hèlix. La formamida permet, doncs, la desnaturalització de l'ADN a temperatura més baixa, fet que fa mantenir una bona morfologia del nucli i dels cromosomes. La concentració òptima de formamida es troba entre el 50 i el 70%, i és la que proporciona una major taxa de desnaturalització i hibridació posterior sense presentar inespecificitat de marcatge en altres cromosomes.

-Desnaturalització de les mostres

Es submergeixen les preparacions en un bany de formamida al 70% en 2xSSC pH7 durant 3 minuts a 70-72°C. Immediatament es procedeix a submergir les preparacions en un bany d'etanol al 70% fred (0-4°C) durant 5 minuts per aturar en sec el procés de desnaturalització i evitar la renaturalització de l'ADN. Tot seguit es prossegueix amb la resta de banys d'etanol al 90 i 100% per a completar el procés de deshidratació. Les preparacions es deixen eixugar a l'aire com a mínim 30 minuts fins el moment de la hibridació.

-Desnaturalització de les sondes

La temperatura i temps de desnaturalització de les sondes és diferent si s'utilitzen sondes centromèriques o de pintat cromosòmic:

.Sondes centromèriques: es col.loquen en un eppendorf 0.5 µL de la sonda centromèrica, 1µL d'ADN d'esperma de salmó i 8.5µL de tampó d'hibridació (formamida al 65%, dextran sulfat al 10% i 20xSSC) (quantitats per cada mostra). Es barreja bé i es col.loca al bany a 70°C durant 5 minuts. Un cop transcorregut aquest temps, es col.loca l'eppendorf en gel durant 1-2 minuts.

.Sondes de pintat cromosòmic: abans de desnaturalitzar la sonda cal preescalfar-la, de manera que es col.loca tot el tub de la sonda del cromosoma que es vulgui hibridar durant 5 minuts a 37°C. Tot seguit, es col.loquen 10 µL de sonda (per cada mostra) i es desnaturalitzen de 5 a 10 minuts en un bany a 72°C. Finalment, es col.loca l'eppendorf amb la sonda en un bany a 37°C durant un període de 30 minuts a 2 hores abans d'hibridar.

C. Reacció d'hibridació

Les sondes utilitzades han estat les següents:

-Sondes centromèriques (Oncor):

Sonda de la regió centromèrica del cromosoma 12 marcada amb biotina (pSP12-1, que conté el fragment EcoRI de 340 pb).

-Sondes de pintat cromosòmic (Cambio):

Les sondes de pintat cromosòmic estan formades per una bateria o llibreria de sondes que abarquen la totalitat del cromosoma. En el present treball s'han utilitzat les sondes dels cromosomes 1, 2, 3, 4, 7, 9, 11, 12, 13, 14, 17, 18 i 20 (article 2) i 1, 3, 6, 7, 8, 11, 12, 13, 14 i 18 (article 3).

Per tal que tingui lloc la hibridació es col.loquen 10 µL de sonda i tampó d'hibridació sobre cada preparació i es cobreixen amb un cobreobjectes. Es segellen els cobreobjectes amb cola i s'incuben les mostres durant tota la nit en una cambra humida a 37°C.

D. Rentats de post-hibridació

Els rentats de posthibridació permeten eliminar l'excés de sonda que no ha hibridat i també dissociar els possibles híbrids no perfectes que s'hagin format entre regions amb una homologia molt elevada però no total. L'eficàcia d'aquests rentats dependrà de la concentració de formamida, la concentració de sals i la temperatura (Hopman i col., 1988). Els rentats utilitzats pels diferents tipus de sondes han estat els següents:

-Sondes centromèriques: Es realitzen tres rentats en una solució de formamida al 65% durant 5 minuts a 42°C, tres rentats en 2xSSC durant 5 minuts a 42°C i dos rentats en 2xSSC durant 5 minuts a 37°C. Després es col.loquen les preparacions en una solució de 1xPBS amb 0.05% de Tween-20 a temperatura ambient fins el procés de detecció de senyals.

-Sondes de pintat cromosòmic: Es realitzen tres rentats en una solució de formamida al 50% durant 5 minuts a 45°C i tres rentats en 0.1xSSC durant 5 minuts a 60°C. Després es col.loquen les preparacions en una solució de 1xPBS amb 0.05% de Tween-20 a temperatura ambient fins el procés de detecció de senyals.

E. Detecció dels senyals d'hibridació pel mètode d'immunoperoxidasa

El procés immunoenzimàtic de detecció de senyals es realitza a través d'una sèrie d'incubacions en cambra humida a 37°C amb diferents anticossos. Totes les dil.lucions, així com els rentats, es fan amb una solució de 1xPBS amb 0.05% de Tween-20.

- S'incuben les preparacions amb sèrum normal de conill (NRS) al 2% durant 30 minuts
- Es realitzen tres rentats de 5 minuts a temperatura ambient.
- S'incuben les preparacions amb sèrum normal de ratolí al 2% i l'anticòs anti-biotina de ratolí al 2% (MAB) durant 45 minuts.
- Es realitzen tres rentats de 5 minuts a temperatura ambient.
- S'incuben les preparacions amb sèrum normal de ratolí al 2% i l'anticòs de conill anti-ratolí conjugat amb peroxidasa (RAMPO), dil.lució 1/80, durant 45 minuts.
- Es realitzen tres rentats de 5 minuts a temperatura ambient.
- S'incuben les preparacions a 37°C durant 10 minuts en una solució de coloració de diaminobenzidina (70 mL PBS-imidazol, 5 mL diaminobenzidina i 200µL de peròxid d'hidrògen).
- Es realitzen tres rentats de 5 minuts amb aigua destil.lada a temperatura ambient.

Les zones híbrides es manifesten com a taques de color ocre més o menys intens. Per a contrastar els nuclis en interfase i les metafases s'utilitza el colorant de Wright/Sörensen (tinció de 2-3 minuts).

F. Observació al microscopi òptic

Les preparacions s'han examinat en un microscopi òptic de llum convencional Olympus BH2 utilitzant els objectius de x10, x50 i x100.

2.2.2.2.2. Protocol d'HIS amb marcatge directe amb fluorescència. Sondes centromèriques i de locus específic

El protocol que s'utilitza en aquest tipus de sondes és molt més curt i simplificat. Se segueixen bàsicament les instruccions que dona la casa comercial (Vysis, en el nostre cas).

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

-Desnaturalització de les mostres

Es submergeixen les preparacions en un bany de formamida al 70% en 2xSSC pH7 durant 5 minuts a 74°C. Immediatament es procedeix a submergir les preparacions en un bany d'etanol al 70% fred (0-4°C) durant 2 minuts per aturar en sec el procés de desnaturalització i evitar la renaturalització de l'ADN. Tot seguit es prossegueix amb la resta de banys d'etanol al 85 i 100% per completar el procés de deshidratació. Les preparacions es deixen en etanol al 100% fins el moment de col·locar la sonda desnaturalitzada.

-Desnaturalització de les sondes centromèriques i de locus específic

Es col·loquen en un eppendorf 1µL de la sonda, 2µL d'aigua destil·lada i 7µL de tampó d'hibridació (formamida al 65%, dextran sulfat al 10% i 20xSSC) (quantitats per cada cas). S'agita bé i es tapa amb paper d'alumini ja que la sonda està marcada directament amb un fluorocrom i el contacte amb la llum li pot fer perdre intensitat de fluorescència. Es centrifuga la barreja 5 segons i es col·loca al bany a 74°C durant 5 minuts. Un cop transcorregut aquest temps, es torna a centrifugar la sonda per recollir-la tota al fons de l'eppendorf i es col·loca dins la cambra humida que haurem preparat i col·locat sobre la placa calefactora a 45-50°C fins el moment d'hibridar.

B. Reacció d'hibridació

Les sondes utilitzades han estat les següents:

-Sondes centromèriques:

. Sonda de la regió centromèrica del cromosoma 3 (CEP 3): aquesta sonda abarca la regió p11.1-q11.1 del cromosoma 3. S'ha utilitzat marcada directament amb *Spectrum Orange*.

. Sonda de la regió centromèrica del cromosoma 12 (CEP 12, D12Z3): aquesta sonda abarca la regió p11.1-q11 del cromosoma 12. S'ha utilitzat tan marcada directament amb *Spectrum Green* com amb *Spectrum Orange*.

. Sonda de la regió centromèrica del cromosoma 17 (CEP 17, D17Z1): aquesta sonda abarca la regió p11.1-q11 del cromosoma 17. S'ha utilitzat tan marcada directament amb *Spectrum Orange*.

. Sonda de la regió centromèrica del cromosoma 18 (CEP 18, D18Z1): aquesta sonda abarca la regió p11.1-q11 del cromosoma 18. S'ha utilitzat tan marcada directament amb *Spectrum Green*.

-Sondes específiques de locus:

. Sonda específica de locus de la regió 13q14 (LSI 13, Rb locus, band 13q14): aquesta sonda abarca la regió 13q14 on es localitza el gen de retinoblastoma (RB1 o Rb). S'ha utilitzat marcada directament amb *Spectrum Orange*.

.Sonda específica de locus de la regió 17p13.1 (LSI p53): Aquesta zona abarca una regió de 130 Kb a 17p13.1 on es localitza el gen TP53. S'ha utilitzat marcada directament amb *Spectrum Orange*.

La mostra es posa sobre la placa calefactora, durant 2 minuts com a màxim, abans de posar-hi la sonda. Tot seguit es col.loquen 10 µL de sonda sobre cada preparació i es cobreix amb un cobreobjectes. Es segella amb cola i s'incuben les mostres durant tota la nit en una cambra humida a 37°C. Cal realitzar el procés en absència de llum ja que les sondes estan marcades directament amb fluorescència.

C. Rentats de post-hibridació

Es realitzen tres rentats en una solució de formamida al 50% durant 10 minuts a 45°C, un rentat en 2xSSC durant 10 minuts a 45°C i un rentat en 2xSSC/0.1%Tween-20 durant 5 minuts a 45°C. És recomanable que la mostra no s'eixugui del tot abans de posar-hi la contratinció.

• **Contratinció**

Per tal de poder observar el fons de la preparació (els cromosomes i els nuclis en interfase) es col·loquen sobre les preparacions 10 µL de DAPI II (DAPI + *Antifade*) a l'àrea seleccionada i un cobreobjectes a sobre. El DAPI és un fluorocrom que s'uneix de forma inespecífica a tot l'ADN i ens permet veure'l de color blau intens amb un filtre de fluorescència adequat. Les preparacions es guarden a -20°C durant 30 minuts i, passat aquest temps, es pot procedir a l'observació.

E. Observació al microscopi de fluorescència i obtenció d'imatges de FISH

Les preparacions s'han examinat en un microscopi òptic amb dispositiu d'epifluorescència NIKON Eclipse 600. S'han utilitzat els objectius de x10 i x100. Per obtenir imatges de FISH s'ha utilitzat el sistema d'anàlisi d'imatges digital Cytovision (Applied Imaging).

2.2.2.3. Criteris de valoració de la HIS i establiment dels nivells de tall per a cada tipus de sonda

Els criteris utilitzats en la valoració de la HIS han estat els següents:

A. Nombre de cèl·lules analitzades:

- Sondes centromèriques: s'han analitzat un mínim de 200 nuclis per cas.
- Sondes específiques de locus: s'han analitzat un mínim de 100 nuclis per cas.
- Sondes de pintat cromosòmic: s'han analitzat un mínim de 10 metafases per cas.

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

- Sondes centromèriques i específiques de locus: per cada tipus de sonda (centromèriques dels cromosomes 3 i 12, LSI 13q14 i LSI p53) s'ha aplicat la tècnica d'HIS en una sèrie de 10 individus control sans (mostres de sang perifèrica, medulla òssia i gangli limfàtic).

En les *sondes centromèriques* s'han valorat un total de 500 nuclis per cas, fent un recompte del nombre de nuclis amb cap, un, dos, tres i quatre o més senyals. Els nivells de tall per establir la diferència entre els resultats veritablement positius i els falsos positius per a monosomies, trisomies i tetrasomies s'obtenen de calcular la mitjana ± 2 vegades la desviació estàndart ($M \pm 2SD$). Aquests nivells de tall per a sondes centromèriques en el nostre laboratori s'han establert a 5% per a trisomies i 15% per a monosomies.

En les *sondes específiques de locus* s'han valorat un total de 200 nuclis per cas, fent un recompte del nombre de nuclis amb cap, un, dos, tres i quatre o més senyals. Els nivells de tall per establir la diferència entre els resultats veritablement positius i els falsos positius per a delecions, trisomies i tetrasomies parcials per la regió estudiada s'obtenen també de calcular la mitjana ± 2 vegades la desviació estàndart ($M \pm 2SD$). Aquests nivells de tall per a sondes de locus específic en el nostre laboratori s'han establert a 5% per detecció de guanys i 15% per detecció de pèrdues o delecions.

- Sondes de pintat cromosòmic: és molt difícil establir uns nivells de tall per aquest tipus de sondes, ja que es valoren unes alteracions estructurals específiques en cada cas, que pot ser que no es repeteixin en els altres casos. Així doncs, en el nostre cas vàrem posar a punt la tècnica en el laboratori utilitzant controls sans i vàrem validar el bon funcionament d'aquesta. En aquest treball hem considerat un resultat com a positiu quan una alteració estructural concreta s'ha confirmat com a mínim en dues metafases del mateix individu.

2.3. REACTIUS I SOLUCIONS

2.3.1. Components del medi de cultiu

- RPMI-1640 (Biological Industries)
- Heparina sòdica 1% (Rovi)
- Sèrum boví fetal (Biological Industries)
- L-Glutamina 200 mM (Biological Industries)
- Penicil.lina (10.000 UI/mL)-Estreptomicina (10µg/mL) (Gibco)

2.3.2. Tècnica de citogenètica convencional

1. Mitògens

- Fitohemaglutinina (PHA) (Gibco)
- Acetat de miristat de tetraforbol (TPA) (Sigma)
- Pokeweed mitogen (PWM) (Gibco)
- Lipopolisacàrid d' Escherichia coli (LPS) (Sigma)
- Dextran sulfat (DXS) (Sigma)

2. Antimitòtic

- Colcemid 10µg/mL (Biological Industries)

3. Hipotònic

- Solució de clorur potàssic 0.075 M (Merck)

4. Fixador

- Carnoy
 - .3 parts de metanol p.a. (Merck)
 - .1part d'àcid acètic p.a. Merck)

5. Colorant

-Colorant de Wright (Sigma)

- .0.25% en metanol p.a. (Merck)
- . Agitar durant una hora a temperatura ambient
- . Incubar durant 72 hores en estufa a 37°C
- . Conservar a la nevera fins el moment de ser utilitzat

-Tampó de Sörensen

- .4,539 mg/mL fosfat monopotàssic (Merck)
- .5,938 mg/mL fosfat disòdic (Merck)

2.3.3. Tècnica d'hibridació in situ

1. Pretractaments

- RNAsa (Sigma)
- Pepsina (Sigma)
- Àcid clorhídric fumant al 37% p.a. (Merck)
- Formaldehid en solució aquosa al 39% p/v (Merck)
- Solució de 10xPBS
 - . 4 mg/mL fosfat monopotàssic dihidratat (Merck)
 - .23 mg/mL fosfat disòdic monohidratat (Merck)
 - .80 mg/mL florur sòdic (Merck)

2. Desnaturalització

- Solució de formamida al 70%
 - . Formamida, p.a. (Merck)
 - . Solució de 20xSSC (pH 6.2-6.3)
 - .88.23 mg/mL citrat trisòdic dihidratat (Merck)
 - .175.32 mg/mL clorur sòdic (Merck)

3. Deshidratacions

- Solucions d'etanol, p.a. (Merck) al 70, 90 i 100%

4. Sondes

-Centromèriques

- . *Alpha satellite 3 DNA probe* (CEP 3) marcada amb *Spectrum Orange* (VYSIS)
- . *Alpha satellite 12 DNA probe* (CEP 12) marcada amb *Spectrum Green* o *Spectrum Orange* (VYSIS)
- . *Alpha satellite 12 DNA probe* (D12Z3) marcada amb biotina (Oncor)
- . *Alpha satellite 17 DNA probe* (CEP 17) marcada amb *Spectrum Orange* (Vysis)
- . *Alpha satellite 18 DNA probe* (CEP 18) marcada amb *Spectrum Green* (Vysis)

-Pintat cromosòmic

- . *Star FISH paint box-Biotin labelled* (Cambio)

- Específiques de locus

- . Sonda LSI 13 (13q14, Rb) marcada amb *Spectrum Orange* (Vysis)
- . Sonda LSI p53 (17p13) marcada amb *Spectrum Orange* (Vysis)

5. Solució d'hibridació per la sonda centromèrica marcada amb biotina

-Mix d'hibridació

- .Solució de formamida al 65%
- .Dextran sulfat 10% (Sigma)
- .Solució de 20xSSC (Merck)

-ADN d'esperma de salmó (Sigma)

6. Rentats de posthibridació

- Solució de formamida al 65%
- Solució de formamida al 50%
- Solució de 2xSSC (100 mL de 20xSSC i 900 mL d'aigua destil.lada)
- Solució de 0.1xSSC (5 mL de 20xSSC i 995 mL d'aigua destil.lada)
- Solució de 2xSSC/Tween-20 al 0.1% (100 mL de 20xSSC, 900 mL d'aigua destil.lada i 1mL de Tween-20 (Sigma))

7. Detecció de la hibridació. Mètode indirecte

- Reacció immunocitoquímica
 - . Sèrum normal de conill (NRS) (Dako)
 - . Anticòs monoclonal de ratolí antibiotina (MAB) (Dako)
 - . Anticòs monoclonal de conill antiratolí conjugat amb peroxidasa (RAMPO) (Dako)
- Solució de coloració
 - . Tetrahidroclorur de diaminobenzidina 0.5 mg/mL (Sigma)
 - . Imidazole 0.65% en solució fosfatada (Merck)
 - . Peròxid d'hidrògen 0.06% (Merck)

8. Detecció de la hibridació. Mètode directe

- DAPI II (DAPI+*Antifade*) (Vysis)

3. ARTICLES

3.1. Article 1.

Cytogenetic and in situ hybridization findings in 27 patients with atypical B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 84: 569-571, 1999.

We performed FISH using specific centromeric probes for chromosomes 3, 7, 11 and 18 on cultured peripheral blood cells, because these are frequently involved in plasma cell dyscrasias.^{3,4,6} We evaluated 500 nuclei per probe. Trisomy 3 was detected in 34.8% of the cells and trisomy 18 in 27.2%. Disomy for chromosomes 7 and 11 (94.2% and 91.2% of the cells respectively) was observed.

The combination of MGG staining and FISH with a centromeric probe for chromosome 18 was performed as described by Anastasi *et al.*⁵ Previously photographed cells were relocated for evaluation of FISH signals on peripheral blood lymphocytes and plasma cells. One hundred and fifty-two cells were studied: 82/116 plasma cells and 10/36 lymphocytes could be tested for FISH signals. Trisomy 18 was found in 65% of the plasma cells (52/82) and in 1 out of 10 lymphocytes (Figures 1 and 2). We observed that not all but a large proportion of plasma cells had trisomy 18, suggesting that the numerical cytogenetic abnormality could be a secondary change. In addition, we detected trisomy 18 in only one out of ten circulating lymphocytes. Although clonotypic rearrangements as defined by the bone marrow plasma cells in myeloma have been reported among blood lymphocytes, the precise nature of the peripheral blood B cells in MM remains unclear.⁷⁻¹⁰ Our results suggest that peripheral blood lymphocytes probably belong to the malignant clone but we can not exclude a false FISH signal.

The present report shows the usefulness of the FISH technique in detecting numerical abnormalities not observed by conventional cytogenetic studies and that the combined MGG-FISH technique is a sensitive test for identifying the cell-lineage of cytogenetic abnormalities.

Elisabet Lloveras, Francesc Solé, Blanca Espinet,
Lourdes Florensa, Antonia Vázquez, * Soledad Woessner

Laboratori de Citologia Hematològica, Unitat d'Hematologia 1973,
Laboratori de Referència de Catalunya, Hospital de l'Esperança;
Servei d'Hematologia, Unitat d'Hematologia 1973; *Servei de
Medicina Intensiva. Hospital del Mar (IMAS), Institut Municipal
d'Investigació Mèdica (IMIM), Barcelona, Spain

Keywords

MGG-FISH, cytogenetics, plasma cell leukemia, PCL, FISH

Acknowledgments

This work was supported by grant FIS 97/0655 from the "Ministerio de Sanidad y Consumo", Spain.

Correspondence

Elisabet Lloveras Caballé, Laboratori de Citologia Hematològica, Unitat d'Hematologia 1973, Laboratori de Referència de Catalunya, Hospital de l'Esperança, Av. St Josep de la Muntanya, 12, Barcelona 08024, Spain. Phone: international + 34-93-285-02-00 ext. 2189-2243 – Fax: international + 34-93-210-84-06 – E-mail: e0037@imas.imim.es

References

1. Bernasconi C, Castelli G, Pagnucco G, Brusamolino E. Plasma cell leukemia: a report on 15 patients. *Eur J Haematol* 1989; 43(Suppl 51):76-83.
2. Dimopoulos DA, Palumbo A, Delasalle KB, Alexanian R. Primary plasma cell leukaemia. *Br J Haematol* 1994; 88:754-9.
3. Drach J, Schuster J, Nowotny H, et al. Multiple myeloma: high incidence of chromosomal aneuploidy as detected by interphase fluorescence in situ hybridization. *Cancer Res* 1995; 55(17):3854-9.
4. Zandecki M, Lai JL, Facon T. Multiple myeloma: almost all patients are cytogenetically abnormal. *Br J Haematol* 1996; 94:217-27.
5. Anastasi J, Vardiman JW, Rudinski R, et al. Direct correlation of cytogenetics findings with cell morphology using in situ hybridization: an analysis of suspicious cells in bone marrow specimens of two patients completing therapy for acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1991; 77:2456-62.
6. Drach J, Angerler J, Schuster J, et al. Interphase fluorescence in situ hybridization identifies chromosomal abnormalities in plasma cells from patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood* 1995; 86:3915-21.
7. Kay N, Leong T, Van Ness B, et al. Circulating CD19+ blood cells in multiple myeloma: phenotypic and molecular analysis of ECOG trial E9486/9487. *Blood* 1995; 86(suppl.1):275a.
8. Pilarski L, Masellis-Smith A, Szczepek A, Mant MJ, Belch AR. Circulating clonotypic B cells in the biology of multiple myeloma: speculations on the origin of myeloma. *Leuk Lymphoma* 1996; 22:375-83.
9. Billadeau D, Van Ness B, Kimlinger T, et al. Clonal circulating cells are common in plasma cell proliferative disorders: a comparison of monoclonal gammopathy of undetermined significance, smoldering multiple myeloma and active myeloma. *Blood* 1996; 88:289-96.
10. Zandecki M, Bernardi F, Genevieve F, et al. Involvement of peripheral blood cells in multiple myeloma: chromosome changes are the rule within circulating plasma cells but not within B lymphocytes. *Leukemia* 1997; 11:1034-9.

Cytogenetic and in situ hybridization findings in 27 patients with atypical B-cell chronic lymphocytic leukaemia

Sir,

Atypical B-CLL (aCLL) is a cytologically differentiated form of B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) first described by the FAB group.¹ aCLL is the variant that has 10-55% of large lymphocytes, prolymphocytes and/or centrocytes.¹ The most common cytogenetic abnormality associated with aCLL is trisomy 12.²⁻⁷ Other chromosomal abnormalities involve 4q, 6q21-q23, 11q, t(11;14)(q13;q32), 13q14, 17p and 17q.^{4-6,8} The aim of the present study is to describe the cytogenetic findings in a series of 27 aCLL, focusing our interest on the detection of trisomy 12, del(13)(q14) and del(17)(p13) combining conventional cytogenetics (CC) with *in situ* hybridiza-

Table 1. Cytogenetic and ISH features in 27 patients with aCLL.

Case	Karyotype (Conventional cytogenetics)	Mitogens used	% Abnormal metaphases	% Trisomy 12 by ISH	% Monosomy 13q14 by ISH	% Monosomy 17p13 By Ish
1	46, XX [51]	PHA, PWM, LPS	0% (0/51)	24%	1%	0%
2	46, XY [38]	PHA, PWM, LPS	0% (0/38)	1%	ND	ND
3	46, XY [18]	PHA	0% (0/18)	2%	ND	ND
4	47, XY, +12 [35]	PHA, PWM, DXS+PHA				
	46, XY [15]	PHA, PWM, DXS+PHA	70% (35/50)	81%	0%	3%
5	46, XY [20]	NM	0% (0/20)	3%	13.5%	0.5%
6	46, XX [18]	TPA, PWM				
	46, XX, +12, -17 [2]	TPA, PWM	10% (2/20)	37%	ND	ND
7	46, XY [29]	PHA, PWM, DXS+PHA	0% (0/29)	2%	1%	1%
8	46, XX [39]	PHA	0% (0/39)	42%	2%	0%
9	46, XY[34]	PHA, LPS	0% (0/34)	1%	2%	2.5%
10	46, XX [18]	PHA				
	46, XX, der(17)t(11;17)(p11;p11) [10]	PHA	56% (10/28)	3%	ND	ND
11	46, XY [32]	PHA	0% (0/32)	27%	1%	0.5%
12	46, XY [35]	PHA				
	47, XY, +12 [4]	LPS	10% (4/39)	66%	2%	0.5%
13	46, XY [25]	PHA				
	45, XY, -13 [2]	PHA	7% (2/27)	30%	1%	1%
14	46, XX [48]	PHA	0% (0/48)	60%	1%	3%
15	46, XY [19]	PHA				
	47, XY, +12 [12]	PHA, LPS	39% (12/31)	60%	2%	0%
16	46, XX [4]	PHA				
	47, XX, +12 [3]	PHA	43% (3/7)	70%	2%	0%
17	46, XY [4]*	NM				
	47, XY, +12 [2]*	NM	33% (2/6)*	19%*30%	1%	4%
18	46, XX [22]	PHA	8% (2/24)	70%		
	47, XX, +12 [2]	PHA				
	46, XX [20]*	NM]*	0% (0/20)*	20%*	ND	ND
	46, XX [11]°	PHA°	18% (3/14) °	39%°		
	47, XX, +ac [3]°	PHA°				
19	46, XX [24]*	PHA	0% (0/24)*	12%*	ND	ND
20	46, XX [46]	PHA	2% (1/47)	2%	6%	2%
	47, XX, t(3;15)(q27;q26) [1]	PHA				
21	46, XY [40]	PHA	0% (0/40)	9%	ND	ND
22	46, XX [57]	PHA	0% (0/57)	2%	0%	0%
23	46, XY [15]	PHA	25% (5/20)	1%	ND	ND
	46, XY, del(7)(q32) [5]	PHA				
24	46, XY [30]	PHA	0% (0/30)	3%	ND	ND
25	46, XY [23]	PHA, TPA	0% (0/23)	2%	0%	0%
26	46, XX [5]	PHA, TPA	75% (15/20)	3%	ND	ND
	46, XX, del(14)(q24), der(18)t(18;22)(q21-22;q11-13) del(20)(q11), -22, +mar [15]					
27	46, XX [48]	PHA, TPA	0% (0/48)	22%	2%	0%

NM: No mitogen; Ac: acentric chromosome; *bone marrow sample; °pleural effusion sample; ND: not done (not enough sample to perform ISH).

tion (ISH) techniques.

Twenty-seven patients with aCLL, diagnosed between 1989 and 1997, were included in this study. Diagnosis was made in all cases according to standard clinical, cytologic and immunologic criteria. CC analyses were carried out on lymphoid cells from peripheral blood stimulated with different mitogens. ISH was performed in all patients using a biotin- or a spectrum green-labeled chromosome 12-specific α -satellite DNA probe (Oncor/CEP 12, VYSIS). In those patients from whom material was available (17/27) a spectrum orange-labeled 13q14 band DNA probe and a spectrum orange-labeled 17p13.1 band DNA probe (LSI 13 and LSI p53, VYSIS) were applied to cultured peripheral blood cells. A minimum of 200 nuclei per case were analyzed.

CC and ISH studies are described in Table 1. Clonal karyotypic aberrations were detected in 10/27 cases (37%), six (22%) had trisomy 12, four as a sole anomaly (15%). Other chromosomes involved were 7, 11, 13, 14, 17, 18, 20 and 22. Seventeen out of 27 patients (63%) showed trisomy 12 by ISH but only six cases (22%) by CC. The percentage of trisomic cells

ranged between 9 and 81%, the median value being 40%. One patient showed 13q14 monosomy, no patient had monosomy 17p13.1.

Table 2 summarizes the main cytogenetic findings in aCLL reported by other authors. We have confirmed our earlier observation⁴ that trisomy 12 represents a distinct morphologic subgroup of B-CLL. The most outstanding finding is the different percentage of trisomy 12 depending on the method used: 22% (6/27) using CC and 63% (17/27) when ISH. In the present series and in others,^{2,4-6} the incidence of trisomy 12 was higher with ISH studies were performed. Taberero *et al.*⁹ observed a significant association between trisomy 12 and a high WBC count, but not with clinical stage. In our series, in agreement with others^{3-4,9} we did not find any association between the karyotype (normal/abnormal/trisomy 12) and the clinical Binet/Rai stage nor between the karyotype and the WBC count. As far as concerns other chromosome anomalies detected by CC, we observed a del(7)(q32), a monosomy 17 associated with trisomy 12, a der(17)t(11;17)(p11;p11) and a complex karyotype involving del(14)(q24) and der(18)t(18;22)(q21-22;q11-13).

Table 2. Comparison between % +12 detected by conventional cytogenetics and by FISH in aCLL series.

Series	Number of aCLL patients analyzed by CC/ISH	Clonal karyotypic aberrations %	+12 detected by conventional cytogenetics %	+12 detected by in situ hybridization %
Criel <i>et al.</i> , 1994 ²	21	57 (12/21)	48 (10/21)	57 (12/21)
Matutes <i>et al.</i> , 1996 ³	39	72 (28/39)	56 (22/39)	ND
Woessner <i>et al.</i> , 1996 ⁴	13	62 (8/13)	31 (4/13)	54 (7/13)
Criel <i>et al.</i> , 1997 ³	67	55 (37/67)	36 (24/67)	ND
Bigoni <i>et al.</i> , 1997 ⁶	43	63 (27/43)	21 (9/43)	33 (14/43)
Hjalmar <i>et al.</i> , 1998 ⁷	37	ND	ND	24 (9/37)
Present series	27	70 (19/27)	22 (6/27)	63 (17/27)

The table only includes those series in which a distinction between aCLL patients and tCLL patients was made. CC: conventional cytogenetics; ISH: in situ hybridization; aCLL: atypical chronic lymphocytic leukemia; CLL: typical chronic lymphocytic leukemia.

Despite the fact that del(13)(q14) is associated with CLL, only one case with this deletion was detected by ISH.⁶ Döhner *et al.*¹⁰ observed that abnormalities of chromosome 17 occur at low frequency (9-15%), most of them being structural abnormalities affecting the short arm, where the TP53 tumor suppressor gene is located. However, among our cases analyzed by ISH no monosomy of 17p13 was detected. Summing up, it is accepted that aCLL constitutes a subgroup distinct from typical CLL (tCLL), with different morphologic features, cytogenetic findings and clinical evolution. Despite the fact that large B-CLL series combine cytogenetic and ISH studies, few authors have distinguished between tCLL and aCLL. Further series would be warranted in order to consider both subtypes of B-CLL separately so as to obtain a better characterization of their cytogenetic and molecular behaviors.

Blanca Espinet, Francesc Solé, Soledad Woessner, Lourdes Florensa, Elisabet Lloveras, Carles Besses

Laboratori de Citologia Hematològica. Unitat d'Hematologia 1973; Laboratori de Referència de Catalunya, Hospital de l'Esperança. Institut Municipal d'Assistència Sanitària (IMAS), Barcelona, Spain

Keywords

Atypical B-cell chronic lymphocytic leukaemia (aCLL), cytogenetics, trisomy 12, 13q14, 17p13, in situ hybridization

Acknowledgements

Supported in part by the grant FI-2.103 about Researchers' Formation from the "Generalitat de Catalunya" and by the grant FIS 97/0655 from the "Ministerio de Sanidad y Consumo". Miguel Gil Garcia, from the "Instituto Municipal de Investigación Médica (IMIM)" was the responsible of the statistical analysis.

Correspondence

Blanca Espinet, Ph.D., Laboratori de Citologia Hematològica, Unitat d'Hematologia 1973, Laboratori de Referència de

Catalunya, Hospital de l'Esperança, Av. St Josep de la Muntanya, 12, 1º, Barcelona 08024, Spain. Phone: international +34-93-2850200 ext. 2189-2243 – Fax: international +34-93-2108406 – E-mail: e0037@imas.imim.es

References

- Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al. The French-American-British (FAB) Cooperative Group: proposals for the classification of chronic (mature) B and T lymphoid leukaemias. *J Clin Pathol* 1989; 42:567-84.
- Criel A, Wlodarska I, Meeus P, et al. Trisomy 12 is uncommon in typical chronic lymphocytic leukaemias. *Br J Haematol* 1994; 87:523-8.
- Matutes E, Oscier D, García-Marco J, et al. Trisomy 12 defines a group of CLL with atypical morphology: correlation between cytogenetic, clinical and laboratory features in 544 patients. *Br J Haematol* 1996; 92:382-8.
- Woessner S, Solé F, Perez-Losada A, Florensa L, Vilà RM. Trisomy 12 is a rare cytogenetic finding in typical chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia Res* 1996; 5:369-74.
- Criel A, Verhoef G, Vlietinck R, et al. Further characterization of morphologic defined typical and atypical CLL: a clinical, immunophenotypic, cytogenetic and prognostic study on 390 cases. *Br J Haematol* 1997; 97:383-91.
- Bigoni R, Cuneo A, Roberti MG, et al. Chromosome aberrations in atypical chronic lymphocytic leukemia: a cytogenetic and interphase cytogenetic study. *Leukemia* 1997; 11:1933-40.
- Hjalmar V, Kimby E, Sundström Ch, et al. Trisomy 12 and plasmacytoid lymphocytes in chronic leukemic B-cell disorders. *Haematologica* 1998; 83:602-9.
- Pérez Losada A, Wessman M, Tiainen P, et al. Trisomy 12 in chronic lymphocytic leukemia: an interphase cytogenetic study. *Blood* 1991; 78:775-9.
- Tabernero MD, San Miguel JF, García JL, et al. Clinical, biological and immunophenotypic characteristics of B-cell chronic lymphocytic leukemia with trisomy 12 by fluorescence in situ hybridization. *Cytometry* 1995; 22:217-22.
- Döhner H, Stilgenbauer S, Fischer K, Bentz M, Lichter P. Cytogenetic and molecular cytogenetic analysis of B cell chronic lymphocytic leukemia: specific chromosome aberrations identify prognostic subgroups of patients and point to loci candidate genes. *Leukemia* 1997; 11:S19-S24.

Massive hemolysis in *Clostridium perfringens* infection

Sir,

Clostridium perfringens infection is a very rare cause of massive intravascular hemolysis, but it should always be kept in mind since early treatment can rescue patients from an otherwise rapidly fatal outcome. We report a case which illustrates the very fast course of this disease, and outline some features that can help to reach a prompt diagnosis.

A 77-year-old woman presented with jaundice and stupor of recent onset. Her temperature was 38°C and