



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Papel del factor de transcripción SOX11 en la caracterización del linfoma de células del manto

Inmaculada Ribera Cortada

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

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

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



UNIVERSITAT DE BARCELONA
FACULTAD DE MEDICINA

TESIS DOCTORAL

Papel del factor de transcripción SOX11 en la
caracterización del linfoma de células del manto

Inmaculada Ribera Cortada

UNIVERSITAT DE BARCELONA
FACULTAD DE MEDICINA

Papel del factor de transcripción SOX11 en la
caracterización del linfoma de células del manto

TESIS DOCTORAL

Estudiante:

Inmaculada Ribera Cortada
Licenciada en Medicina y Cirugía

Director de Tesis:

Profesor Dr. Elías Campo Güerri



Papel del factor de transcripción SOX11 en la caracterización del linfoma de células del manto

Tesis Doctoral

Estudiante:

Inmaculada Ribera Cortada
Licenciada en Medicina y Cirugía

Director de Tesis:

Profesor Dr. Elías Campo Güerri

Departamento:

Departamento de Anatomía Patológica,
Farmacología & Microbiología
Facultad de Medicina
Universidad de Barcelona

Línea de Investigación:

Oncología y Hematología

Marzo 2016 Barcelona

Agradecimientos:

Al Profesor Elías, por su inmensa paciencia y apoyo....muchísimas gracias por darme esta oportunidad y por todo lo que me ha enseñado.

A mi familia, en especial a mis padres. Gracias por vuestro apoyo incondicional.
A vosotros os dedico mi Tesis.

Publicaciones que constituyen esta Tesis Doctoral:

Manuscrito I: SOX11 is useful in differentiating cyclin D1-positive diffuse large B-cell lymphoma from mantle cell lymphoma

Datos:

Revista: Histopathology (Reino Unido)

Factor de Impacto (2015): 3.453

Cuartil: 1er cuartil Patología

Referencia: Histopathology 2012;61:685-93.

PMID: 22642745

Manuscrito II: Plasma cell and terminal B-cell differentiation in mantle cell lymphoma mainly occur in the SOX11-negative subtype

Datos:

Revista: Modern Pathology (EEUU)

Factor de Impacto (2015): 6.187

Cuartil: 1er cuartil Patología

Referencia: Mod Pathol 2015;28:1435-47.

PMID:26360498

Índice

1. <u>Lista de Abreviaturas</u>	10
2.1 <u>Introducción</u>	14
2.1.1 Linfoma de Células del Manto Definición	16
2.1.2 Linfoma de Células del Manto Características	16
2.1.3 Linfoma Linfoplasmocítico	17
2.1.4 Linfoma Linfoplasmocítico Características	17
2.1.5 Linfoma de Células del Manto con Diferenciación Plasmática	18
2.1.6 <i>MYD88</i>	23
2.1.7 Genética del Linfoma de Células Manto	24
2.1.8 Ciclina D1 y el Ciclo Celular	26
2.1.9 Ciclina D1 y Linfoma Difuso de Célula B Grande	28
2.2 <u>Linfoma Difuso de Célula B Grande</u>	28
2.2.1 Linfoma Difuso de Célula B Grande Características	28
2.3 <u>Diferenciación de los Linfocitos B</u>	30
2.3.1 Células Linfoides B naive	30

2.3.2 Centros Germinales B	31
2.3.3 IRF4/MUM1,BLIMP1, PAX5 y XBP1	33
2.3.4 BLIMP1	34
2.3.5 IRF4/MUM1	35
2.3.6 PAX5	35
2.3.7 XBP1	36
2.3.8 Células Plasmáticas	36
2.4 <u>Factor de Transcripción SOX11</u>	<u>39</u>
2.4.1 Familia de genes SOX	39
2.4.2 Factor de Transcripción SOX11	40
2.4.3 SOX11 y Linfoma de Células del Manto	40
3. <u>Hipótesis y Objetivos</u>	<u>47</u>
3.1.1 Primera Hipótesis Manuscrito I	47
3.1.2 Primer Objetivo Principal	47
3.1.3 Objetivo Adicional	47
3.2.1 Segunda Hipótesis Manuscrito II	48

3.2.2 Segundo Objetivo Principal	48
3.2.3 Objetivo Adicional	48
4. <u>Manuscritos realizados, Material, Métodos y Resultados</u>	<u>51</u>
4.1 <u>Manuscrito I</u> : SOX11 is useful in differentiating cyclin D1-positive diffuse large B-cell lymphoma from mantle cell lymphoma	53
4.1.1 Datos	53
4.1.2 Resumen	54
4.2 <u>Manuscrito II</u> : Plasma cell and terminal B-cell differentiation in mantle cell lymphoma mainly occur in the SOX11-negative subtype	64
4.2.1 Datos	64
4.2.2 Resumen	65
5. <u>Discusión</u>	<u>81</u>
6. <u>Conclusiones</u>	<u>98</u>
7. <u>Referencias Bibliográficas</u>	<u>102</u>

1. Lista de Abreviaturas:

ABC-like: Célula B Activada semejantes; Activated B-cell-like (en inglés)

BCL2: Proteína 2 del linfoma de células B; B-cell lymphoma 2 protein (en inglés)

BCL6: Proteína 6 del linfoma de células B; B-cell lymphoma 6 protein (en inglés)

BCR: Receptor de las células B, B-cell receptor (en inglés)

BLIMP-1: Proteína de maduración inducida por linfocitos B 1; B lymphocyte-induced maturation protein 1(en inglés)

CD10 o CALLA: Cúmulo de diferenciación 10; cluster of differentiation 10 (en inglés) ó Antígeno común de la leucemia linfoblástica aguda; Common acute lymphoblastic leukemia antigen (en inglés)

CDK4 y CDK6: Quinasas Ciclina dependientes 4 y 6; Cyclin-dependent kinase 4 and 6 (en inglés)

CSR: Recombinación del cambio de clase; Class Switch Recombination (en inglés)

GCB-like: Centro Germinal B semejantes; Germinal Centre B-cell-like (en inglés)

H & E: tinción hematoxilina-eosina; Hematoxylin and eosin stain (en inglés)

FISH: Hibridación fluorescente in situ; Fluorescence in situ hybridization (en inglés)

IRF4/MUM1: Factor regulador de Interferón 4/Mieloma Multiple1; Interferon regulatory factor 4/Multiple myeloma oncogene 1(en inglés)

LCM: Linfoma de células del Manto

LDCBG: Linfoma Difuso de Célula B Grande

LF: Linfoma Folicular

LLC: Leucemia Linfocítica Crónica

LPL: Linfoma Linfoplasmocítico

LZM: Linfoma de zona Marginal

NF- κ B: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas; nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (en inglés)

MYD88: gen 88 de la respuesta primaria de la diferenciación mieloide, myeloid differentiation primary response gene 88 (en inglés)

PAX5: Proteína de caja apareada 5; Paired Box protein 5 (en inglés)

SHM: Hipermutación somática; Somatic hypermutation (en inglés)

SOX: Proteína de: **SRY related HMG box:** Sex-determining región in Chromosome Y related High Mobility Group box (en inglés)

SOX11-knockdown studies: estudios de silenciamiento del gen *SOX11*

UPR: Respuesta a proteínas desplegadas; Unfolded Protein Response (en inglés)

VDJ de *IGHV*: Segmentos variable, diversidad y de unión de la región variable de la cadena pesada de las inmunoglobulinas; variable V, diversity D, joining J segments of the immunoglobulin heavy chain variable region (en inglés)

XPB1: Proteína fijadora de la caja X 1; X-box binding protein 1(en inglés)

Introducción

2.1 Introducción

El Linfoma de células del Manto (LCM) es un subtipo especial de linfoma B maduro, con una característica sobreexpresión de la proteína nuclear Ciclina D1. Recientemente se ha observado que el factor de transcripción SOX11 tiene también una sobreexpresión específica en este tipo de linfoma. El LCM se caracteriza por presentar en la mayoría de los pacientes, un curso clínico agresivo, aunque se ha observado que algunos pacientes tienen un curso clínico más indolente. Por tanto, desde un punto de vista clínico práctico, es muy importante diferenciar el LCM del resto de los linfomas B maduros, pues nos permite tomar las decisiones terapéuticas más adecuadas.

A pesar de que las características del LCM están bien definidas el diagnóstico diferencial entre el LCM y otros tipos de linfoma B puede ser difícil. Un problema es el diagnóstico diferencial entre el Linfoma Difuso de Célula B Grande (LDCBG) Ciclina D1 positivo y las variedades pleomórfica y blastoide del LCM. No se dispone de criterios bien definidos para distinguir estas dos entidades. Dado que los pacientes se tratan de forma diferente es importante identificar parámetros que permitan establecer el diagnóstico diferencial.

Estudios recientes han identificado algunos LCM que de forma peculiar presentan una diferenciación plasmocelular. Resulta difícil diferenciar el LCM de los linfomas B de célula pequeña con diferenciación plasmática, como por ejemplo el Linfoma Linfoplasmocítico o el Linfoma de la zona marginal. Por otra parte los mecanismos implicados en la diferenciación plasmocelular en LCM no son bien conocidos. Recientemente trabajos de nuestro grupo han implicado SOX11 en el bloqueo de la diferenciación B terminal a través de la expresión forzada de PAX5. Así pues estas observaciones nos permiten postular que la diferenciación plasmocelular y más ampliamente el inicio de la diferenciación B-terminal en LCM se debe producir preferentemente en LCM SOX11 negativos.

En esta Tesis doctoral hemos estudiado el papel del factor de transcripción SOX11 en el LCM para ayudar a diferenciar estos linfomas B. La intención es poder encontrar herramientas prácticas que nos ayuden a poder identificar y caracterizar mejor al LCM.

La identificación correcta de este tipo de linfoma es fundamental para poder tomar las decisiones terapéuticas adecuadas y así poder dar el mejor tratamiento a estos pacientes. Por tanto la identificación y validación de herramientas prácticas para realizar la correcta identificación y caracterización del LCM, es el objetivo principal de esta Tesis. En este sentido estudiaremos el valor de SOX11 y otros parámetros en el diagnóstico diferencial entre el LCM y el LDCBG Ciclina D1 positivo y por otra parte analizaremos extensamente la diferenciación B-terminal en LCM y su relación con la expresión de SOX11.

2.1.1 Linfoma de Células del Manto Definición

El Linfoma de células del Manto (LCM) se caracteriza por ser un tumor de conducta agresiva con una supervivencia media de 3 a 4 años y es uno de los linfomas más difíciles de tratar. Se compone de una proliferación de linfocitos B maduros con una alteración molecular muy específica la t(11;14)(q13;q32), que llevará a la sobreexpresión de Ciclina D1 (1).

2.1.2 Linfoma de Células del Manto Características

El LCM se presenta clínicamente con afectación de múltiples ganglios, bazo, médula ósea y sangre periférica. El LCM es una neoplasia linfoide compuesta en la mayoría de los casos por células de aspecto homogéneo, de pequeño a mediano tamaño, con núcleos irregulares. Se han descrito diversos tipos morfológicos: clásico, célula pequeña, monocitoide, blastoide, y pleomórfico. También se pueden observar diversos patrones de crecimiento: nodular, difuso y zona del manto. La célula linfoide B naive, se considera la célula contrapartida normal de las células tumorales del LCM. Estas células se localizan topográficamente en la zona del manto de los centros germinales B de los ganglios linfáticos y tienen los genes de la región variable de la cadena pesada de las inmunoglobulinas predominantemente no mutados (1,2).

Los linfocitos tumorales del LCM expresan en su superficie marcadores de linfocitos B maduros, IgM, IgD, CD5 y restricción de una cadena ligera preferentemente lambda. En general son negativos para CD10 y BCL6 aunque la positividad a estos marcadores se ha observado en algún casos de morfología blastoide o pleomórfica. Característicamente sobreexpresan la proteína Ciclina D1 en el núcleo (2).

Parámetros histopatológicos que se relacionan con una evolución adversa incluyen una morfología blastoide/pleomorfa, alta actividad mitótica y un alto índice de proliferación reconocido por la expresión de Ki67. El índice de Ki67 es considerado como un importante biomarcador del pronóstico del LCM con casos altamente proliferativos asociados a peor pronósticos en comparación con LCM con bajo índice de proliferación (3,4). Las mutaciones del gen *TP53* también se asocia un peor pronóstico (5). Durante las últimas décadas, el

LCM era considerado como una enfermedad con un pésimo pronóstico, pero la introducción de quimioterapia con altas dosis de Citarabina; autotransplante con células madres y tratamiento con el anticuerpo monoclonal anti-CD20 Rituximab han mejorado el pronóstico y la supervivencia de los pacientes con este linfoma (6).

2.1.3 Linfoma Linfoplasmocítico

El Linfoma Linfoplasmocítico (LPL) se caracteriza por ser un linfoma de linfocitos B de pequeño tamaño con diferenciación plasmocitoide. Su componente celular puede tener un espectro que va desde linfocitos pequeños con escasa diferenciación plasmocitoide a células plasmáticas. La médula ósea suele ser infiltrada por el LPL aunque este linfoma puede afectar en menor grado a los ganglios y el bazo. LPL es un linfoma, que no presenta criterios de cualquier otro tipo de linfoma B de célula pequeña que pueda presentar diferenciación plasmática. La mayoría de estos pacientes tienen una paraproteína sérica IgM monoclonal, clínicamente suele ser un linfoma indolente con una mediana de supervivencia de 5 a 10 años (7,8).

2.1.4 Linfoma Linfoplasmocítico Características

Morfológicamente los linfocitos plasmocitoides demuestran un núcleo excéntrico con amplio citoplasma basófilo. Generalmente se observan pocas células linfoides transformadas. No se encuentran en los linfocitos tumorales las características citológicas de la zona marginal con diferenciación pálida de citoplasma monocitoide. La colonización de los folículos linfoides no es habitual pero puede estar presente. En cambio es frecuente encontrar en el LPL depósitos de hemosiderina y presencia de cuerpos de Dutcher (pseudoinclusiones intranucleares) en los linfocitos plasmocitoides (7,8).

Inmunofenotípicamente el LPL muestra restricción de una cadena ligera y las células plasmáticas presentan una expresión intensa de una inmunoglobulina citoplasmática, habitualmente IgM. También expresan los marcadores de linfocitos B maduros pero son negativos CD5, CD10, CD23 y Ciclina D1. No se observa en LPL la $t(11;14)(q13;q32)$ (7,8).

La presencia de la diferenciación plasmática es la característica fundamental y definitoria del LPL, aunque cierto grado de diferenciación plasmática puede ocurrir en otros tipos de Linfomas B de célula pequeña, como la Leucemia Linfocítica Crónica (LLC), Linfoma Folicular (LF) y el Linfoma de zona Marginal (LZM) (8,9,10).

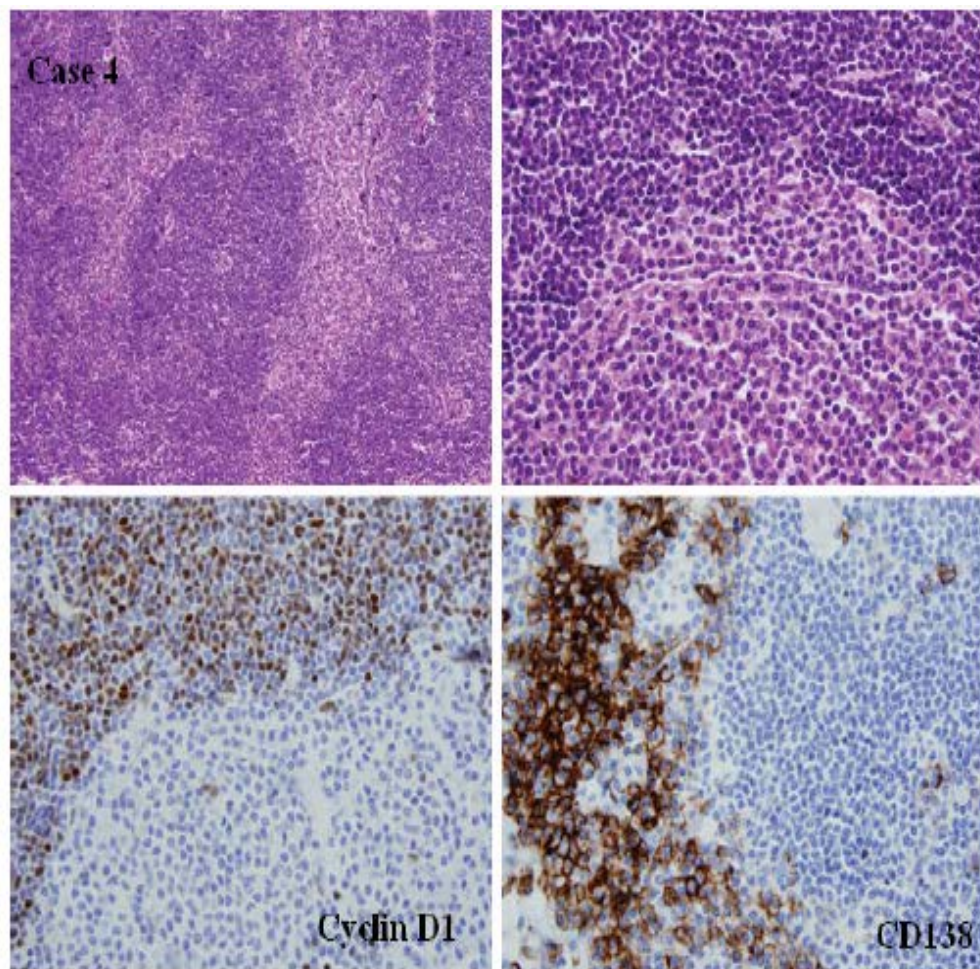
2.1.5 Linfoma de Células del Manto con Diferenciación Plasmática

La mayoría de los LCM se describen como una proliferación monótona linfoide atípica compuesta por linfocitos B maduros sin presencia de diferenciación plasmocelular, aunque diversos estudios han demostrado la presencia de focal diferenciación plasmática con presencia de células plasmáticas maduras monotípicas clonalmente relacionadas a LCM clásicos (11-13).

Young *et al.* (11) presentaron 2 casos de LCM primario con diferenciación plasmática y Naushad *et al.* (12) publicaron 1 caso donde la diferenciación plasmática también se confirmó mediante estudios de citometría de flujo. Visco *et al.* (13) demostraron la relación clonal entre 5 casos de LCM primario y células plasmáticas monotípicas usando estudios moleculares de reordenamiento de RFLP/IgH. En cada caso se identificó idénticos reordenamientos clonales en relación a los LCM y las células plasmáticas monotípicas acompañantes y por tanto se demostró que las células del LCM y las células plasmáticas monotípicas derivaban del mismo clon neoplásico de células B.

Estos casos de LCM con diferenciación plasmática están compuestos por células linfoides neoplásicas que morfológicamente corresponden en su mayoría a LCM clásicos Ciclina D1 y CD5 positivos (Figura 1 Visco *et al.* Caso número 4) (13). Inmunohistoquímicamente se observó la presencia focalmente de una población de células plasmáticas monotípicas con restricción de una cadena ligera en el citoplasma.

Figura 1. Características histológicas y fenotípicas de LCM con diferenciación plasmática clonal. (Caso número 4): masa periorbitaria con patrón de crecimiento nodular de células linfoides atípicas y sabanas de células plasmáticas monotípicas en las zonas internodulares. (Tinción con H&E 10x y 20x respectivamente). Estudio inmunohistoquímico con Ciclina D1 demuestra patrón de crecimiento de la zona del manto (20x). Con CD138 se observa grupos de células plasmáticas monotípicas entre los nódulos linfoides (20x). Las dos poblaciones expresaban la cadena ligera lambda. Visco *et al.* (Caso número 4) (13).



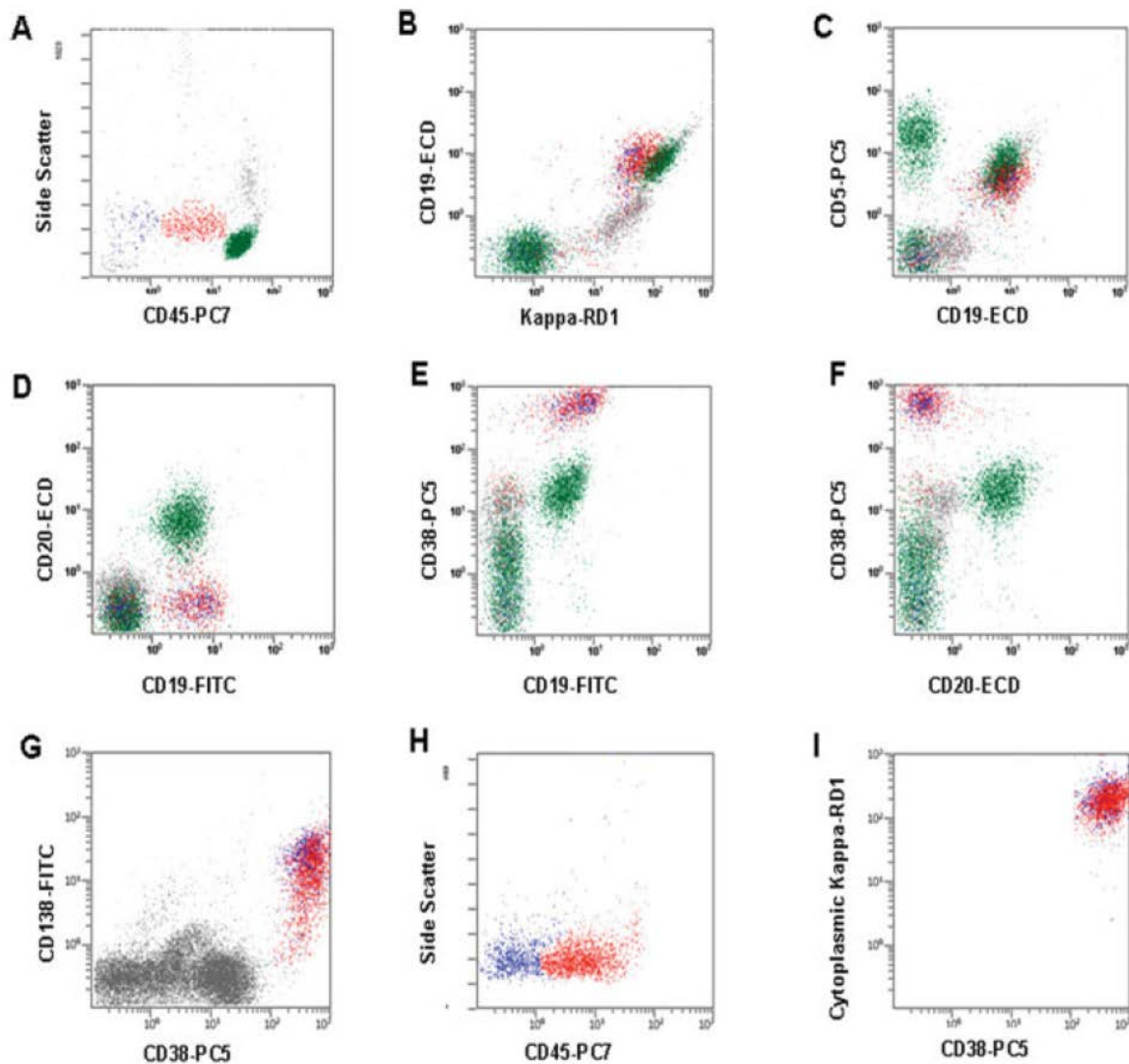


Figura 2. Histogramas de LCM con diferenciación plasmática, estudios de médula ósea mediante citometría de flujo. La población linfóide de células B (color verde) expresa intensamente CD45, CD5, CD19, CD20 con expresión intermedia de CD38 y restricción de cadena ligera kappa en superficie. La población de linfocitos plasmocitoides (rojo) expresa CD45, CD5, CD19 débilmente, CD38 intensamente, demuestra restricción de cadena ligera kappa en superficie pero es negativa a CD20. La población de células plasmáticas clonales (azul) expresa CD5, CD19, demuestra restricción de cadena ligera kappa en superficie pero es negativa a CD45 y CD20. Las tres poblaciones expresan CD38 aunque este marcador es más intenso en los linfocitos plasmocitoides (rojo) y las células plasmáticas clonales (azul). Tanto los linfocitos plasmocitoides (rojo) y las células plasmáticas clonales (azul) son intensamente positivas a CD38 y CD138 y expresan la cadena ligera kappa citoplasmáticamente. Naushad *et al.* (12).

Naushad *et al.* (12) demostró incluso linfocitos atípicos CD5 positivos con la misma restricción de cadena ligera de superficie que la cadena ligera que se observó en el citoplasma de la población de las células plasmáticas monotípicas, sugiriendo que forman parte del mismo tumor. Con citometría de flujo se observó que las células plasmáticas clonales podían también retener la expresión de CD5 (Figura 2 y 3 Naushad *et al.*) (12).

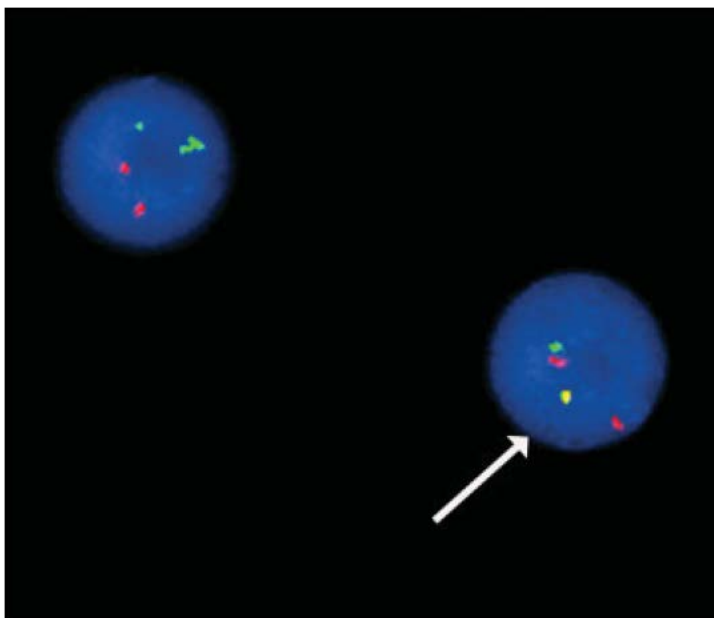


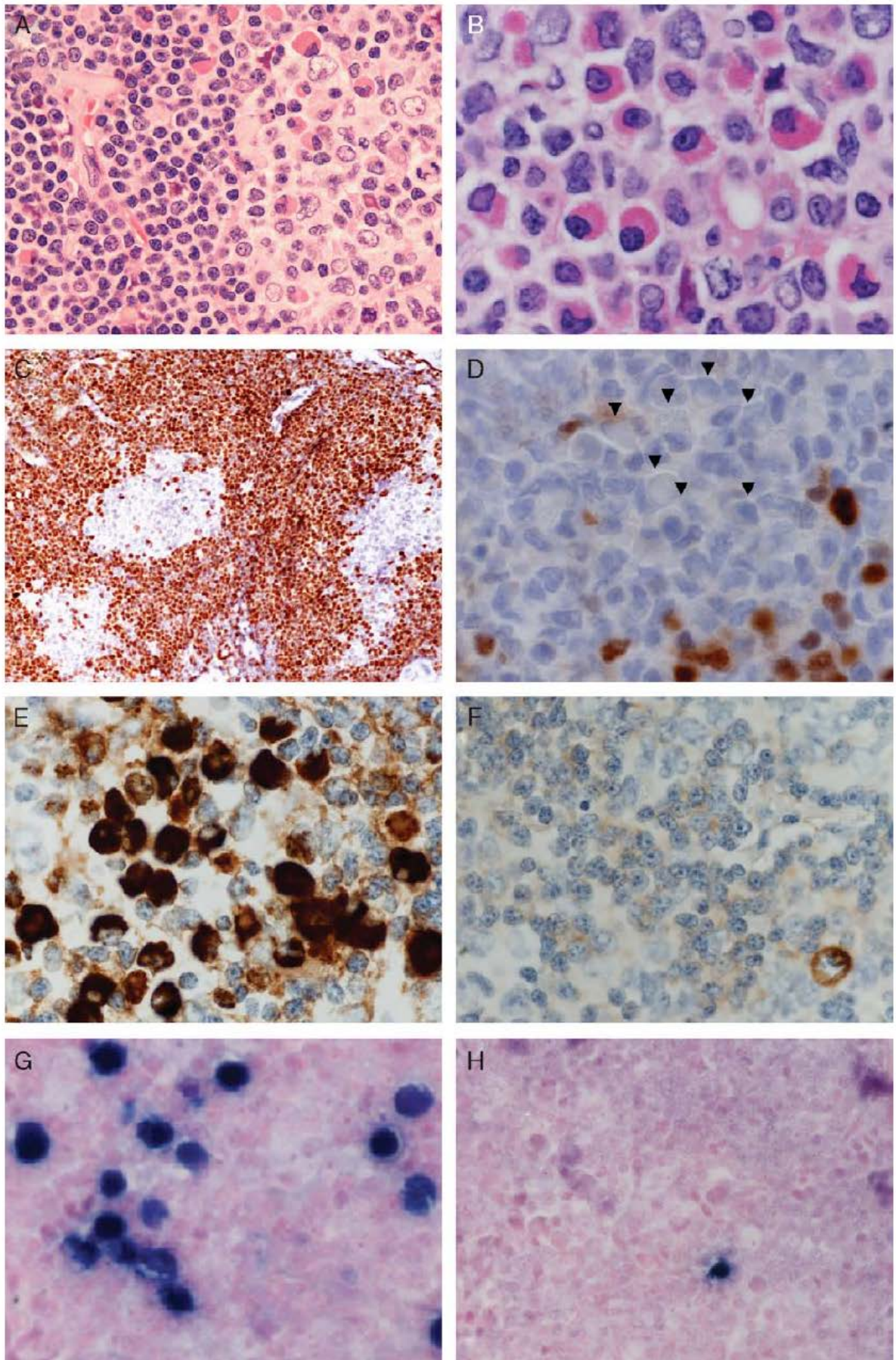
Figura 3. Aspirado de médula ósea con presencia de la t(11;14)(q13;q32). Estudio por FISH con sondas para *IGH* (*IgH* señal verde) y *CCND1* (*CCND1* señal roja). Naushad *et al.* (12).

En algunos de estos casos de Linfoma de células del Manto con diferenciación plasmática se observó un patrón de crecimiento de zona del manto y presencia de centros germinales reactivos. Las células neoplásicas claramente positivas a Ciclina D1 expandían la zona del manto como demostraron Young *et al.* (Figura 4 Caso número 2) (11) y Visco *et al.* (Casos número 2 y 4) (13).

Figura 4. Características histológicas y fenotípicas de LCM con diferenciación plasmática.

A. centro germinal reactivo con zona del manto expandida (H&E 10x). B. grupos de células plasmáticas atípicas en el centro germinal (H&E 40x). C. inmunohistoquímica con Ciclina D1 demostrando un patrón de crecimiento de la zona del manto (10x). D. células de LCM Ciclina D1 positivas en el centro germinal (40x). E. numerosas células plasmáticas expresando cadena ligera kappa (40x). F pocas células positivas a lambda (40x). G. células plasmáticas clonales demostrando restricción a la cadena ligera kappa por hibridación in situ de ARNm (40x). H. pocas células demostrando la cadena ligera lambda por hibridación in situ de ARNm (40x). (Young *et al.* Caso número 2) (11).

Figura 4. Características histológicas y fenotípicas de LCM con diferenciación plasmática.
Young *et al.* (Caso número 2) (11).



2.1.6 MYD88

Recientemente la mutación L265P *MYD88* (gen 88 de la respuesta primaria de la diferenciación mieloide, myeloid differentiation primary response gene 88 en inglés) ha sido reconocida como muy característica de la Macroglobulinemia de Waldenström/ LPL (14). Esta mutación consiste en una variación en la posición 38182641 en el cromosoma 3p22.2 resultando en el cambio de un nucleótido T→C en el gen *MYD88*. Esta variación predice el cambio del amino ácido leucina a prolina en la posición 265 (L265P). A pesar de ser esta mutación característica de LPL puede estar presente en otro tipo de Linfomas como LDCBG de tipo célula B activada (en un 14–29% de los casos), LLC (3%) y en algunos LZM (7%) Tabla 1. (15-18). Varios grupos han estudiado más de 100 casos de LCM, sin encontrar esta mutación (19-23).

<i>Entity</i>	<i>n</i>	<i>MYD88 L265P</i>
Waldenström's macroglobulinemia	117	101 (86%)
IgM MGUS	31	27 (87%)
Non-GC diffuse large cell lymphoma	48	9 (19%)
Marginal zone lymphomas	14	3 (21%)
B-CLL (16 with monoclonal component)	39	0 (0%)
Hairy cell leukemia	35	0 (0%)
Multiple myeloma (three IgM)	24	0 (0%)
IgA/IgG-MGUS	25	0 (0%)
Lymphoplasmacytic lymphoma	9	0 (0%)
Amyloidosis	6	0 (0%)
IgM-related disorder (neuropathy + IgM component)	1	0 (0%)
Healthy volunteers	38	0 (0%)

Abbreviations: GC, germinal center; LPDs, lymphoproliferative disorders; MGUS, monoclonal gammopathies of uncertain significance.

Tabla 1. Estudio de la mutación L265P *MYD88* por PCR. En el estudio se incluyeron 38 donantes sanos, 117 pacientes con Macroglobulinemia de Waldenström y 273 pacientes con síndromes linfoproliferativos de célula B. Jiménez *et al.* (15).

La presencia de diferenciación plasmocelular en LCM es un fenómeno que plantea problemas de diagnóstico diferencial y cuya patogénesis no es bien conocida. Nuestra Tesis abordará el análisis de este fenómeno.

2.1.7 Genética del Linfoma de Células del Manto

Se considera la $t(11;14)(q13;q32)$ el evento genético primario y fundamental en la patogénesis del LCM. La clínica agresiva del linfoma se atribuye a los mecanismos genéticos y moleculares implicados en su patogénesis que combinan las siguientes características: sobreexpresión de Ciclina D1, desregularización del ciclo celular, alto nivel de inestabilidad cromosómica relacionada con la interrupción de los mecanismos de reparación del ADN y la activación de los mecanismos de supervivencia celular (24,25). La $t(11;14)(q13;q32)$ yuxtapone el gen de la cadena pesada de las inmunoglobulinas *IGH* en el cromosoma 14q32 con el protooncogen *CCND1* en 11q13 (1). Como consecuencia, el LCM tiene sobreexpresión del ARNm de Ciclina D1 y de la proteína. Debido a que Ciclina D1 promueve la transición de la fase G_1 a la fase S del ciclo celular, el LCM se caracteriza por una desregulación del ciclo celular (24). La sobreexpresión de Ciclina D1 también puede encontrarse en otras neoplasias hematológicas como algunos subtipos de mieloma, la tricoleucemia y en algún otro caso de Linfoma Difuso de Célula B Grande. Sin embargo estos dos últimos no se asocian a la $t(11;14)(q13;q32)$ (26-28).

Estudios recientes han demostrado la característica y específica sobreexpresión del factor de transcripción SOX11 en el LCM. SOX11 es un factor de transcripción implicado en la neurogénesis embrionaria y en la remodelación de tejidos. La expresión específica de SOX11 en el LCM, hace que se considere como un marcador de diagnóstico muy específico para este linfoma, pero SOX11 también puede expresarse en la tricoleucemia, Linfoma de Burkitt y neoplasias linfoides inmaduras a niveles inferiores (29-32).

La aparición inicial de la $t(11;14)(q13;q32)$ ocurre en las células Pre-B durante la recombinación, antígeno independiente, de los genes de los segmentos VDJ (segmentos: variable, diversidad y de unión) de la región variable de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (*IGHV*). Este proceso ocurre en la médula ósea. Paradójicamente este tumor está compuesto por una población de linfocitos B maduros, indicando que el fenotipo completo neoplásico se adquiere en estadios más avanzados de la diferenciación de las células B (1).

Recientes estudios del receptor de las células B (BCR) han demostrado un modelo complejo, en el cual, la selección antigénica juega un papel importante en la patogénesis de un subgrupo de LCM, pues en un 15-40% de los casos de LCM, se observa una hipermutación somática de los genes de la región variable de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (*IGHV*) (1,2).

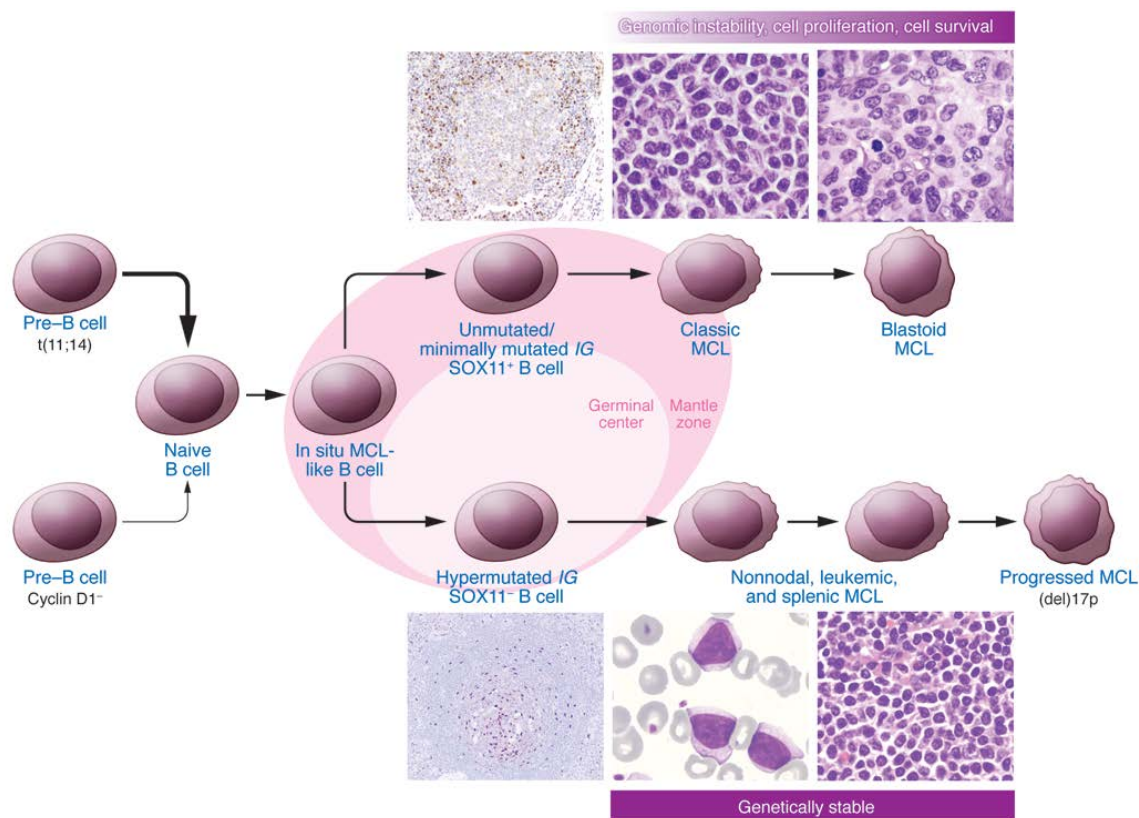


Figura 5. Hipotéticamente se postula dos subtipos moleculares diferentes de LCM. Las células linfoides B naive que llevan la t(11;14)(q13;q32) colonizan la zona del manto de los folículos linfoides y generan una lesión in situ del LCM. La mayoría de LCM evolucionan de estas células o células en la zona marginal que muestran un número muy limitado de mutaciones somáticas de *IGHV* y estos tumores expresan positivamente SOX11. Alternativamente, algunas células con la t(11;14)(q13;q32) pueden entrar en el centro germinal B y tener hipermutaciones de *IGHV*. Estos linfomas no suelen expresar SOX11. Jares *et al.* (1).

Hipotéticamente se postula dos subtipos moleculares diferentes de LCM. Se considera que las células linfoides B naive que llevan la t(11;14)(q13;q32) colonizan la zona del manto de folículos de los ganglios, generando una lesión In Situ del LCM. La mayoría de los LCM

evolucionan de estas células con limitadas mutaciones somáticas de la región *IGHV*. Estos tumores que expresan de forma positiva SOX11, son genéticamente inestables, tienen tendencia a acumular alteraciones en genes desregulando el ciclo celular, alterando mecanismos de respuesta al daño del ADN y mecanismos de supervivencia celular.

Alternativamente algunas células con la $t(11;14)(q13;q32)$ pueden entrar en el centro germinal B y acumulan hipermutaciones somáticas en la región *IGHV*. Estas células son genéticamente estables, no expresan SOX11 y los tumores derivados de estas células afectan con más frecuencia la sangre periférica y el bazo, que los ganglios linfáticos. Estos casos suelen ser estables clínicamente pero algunos tumores pueden adquirir mutaciones de genes como *TP53* que conllevan a la progresión de la enfermedad (Figura 5) (1,33).

2.1.8 Ciclina D1 y el Ciclo Celular

La alteración genética característica y responsable de la patogénesis del LCM es la $t(11;14)(q13;q32)$, que yuxtapone el gen *CCND1* del cromosoma 11q13 con la región 14q32 de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas. Esta translocación determina la desregularización de la expresión de la proteína Ciclina D1 (*CCND1*) (34). La proteína Ciclina D1 no se expresa normalmente en linfocitos o células mieloides normales; pero es constantemente expresada en los LCM, indicando su importante función en la patogénesis de este linfoma. Ciclina D1 participa en la regularización de la transición de la fase G_1 a la fase S del ciclo celular, esta regularización se realiza en combinación con las Quinasas Ciclina dependientes 4 y 6 (CDK4 y CDK6) (34).

El gen *CCND1* está compuesto de cinco exones, que pueden ser segmentados alternativamente, a las isoformas proteicas Ciclina D1a y Ciclina D1b. En la mayoría de los casos, los ARNms de las dos formas están coexpresados, aunque la proteína Ciclina D1b no se detecta de forma constante y su función en la patogénesis del LCM no está clara (35).

Ciclina D1a es una proteína de 30 kDa que forma complejos enzimáticos con las Quinasas Ciclina dependientes CDK4 ó CDK6 ambas sobreexpresadas en LCM, para promover la progresión del ciclo celular. El complejo Ciclina D1a con CDK4/6 fosforiliza la proteína del

retinoblastoma (RB), inactivando su efecto supresor sobre la progresión del ciclo celular. Esta fosforilación libera los factores de transcripción E2F, secuestrados por RB y promueve la transición de la fase del ciclo celular G₁ a S. Además, los complejos Ciclina D1/CDK4 tienen funciones Quinasas independientes, principalmente bloqueando ó degradando al inhibidor del ciclo celular p27, que es apartado del complejo Ciclina E/CDK2, facilitando la progresión de la célula tumoral de la fase G₁ a S del ciclo celular (Figura 6) (35).

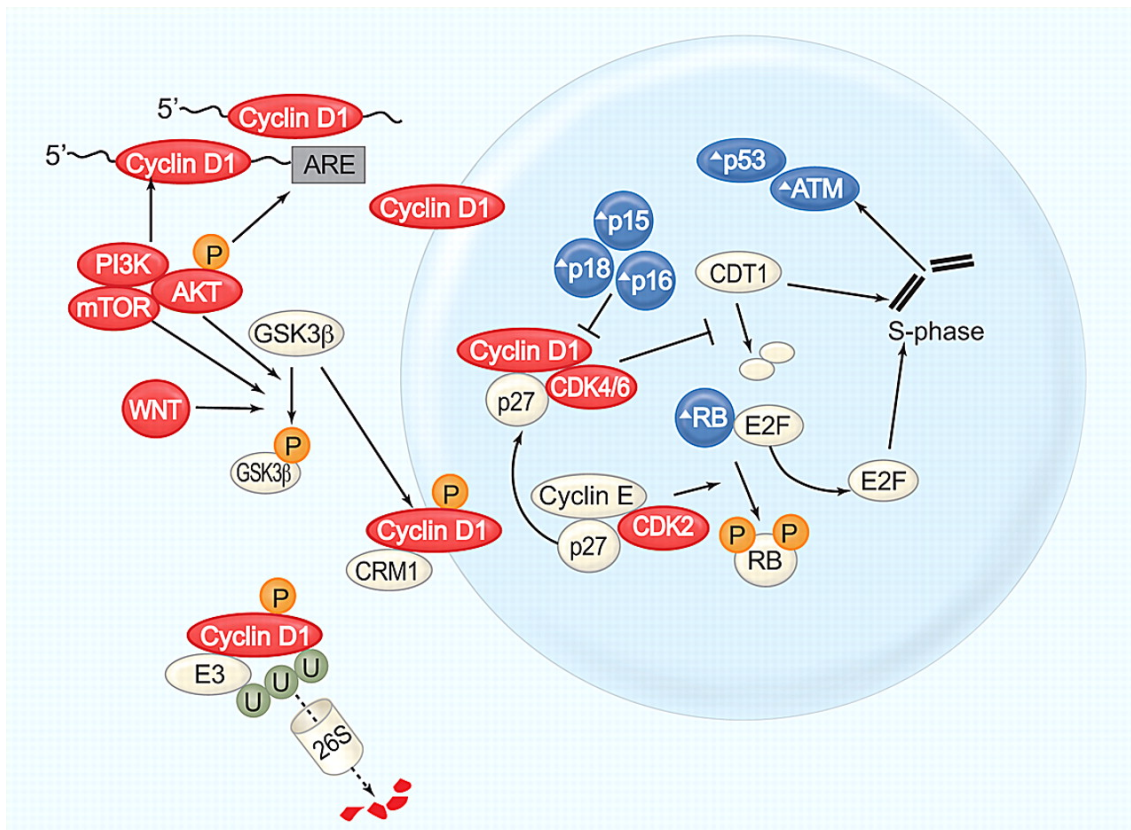


Figura 6. Varios componentes del control del ciclo celular están alterados en el LCM. Las moléculas en azul, están inactivadas ó suprimidas mientras que las de color rojo están activadas ó sobreexpresadas. Pérez-Galán *et al.* (35).

Todas estas observaciones indican que la desregularización de Ciclina D1 juega un papel muy importante en la patogénesis del LCM, probablemente al sobrepasar los efectos supresores sobre el ciclo celular de las proteínas del retinoblastoma (RB) y p27.

2.1.9 Ciclina D1 y Linfoma Difuso de Célula B Grande

Aunque la sobreexpresión de Ciclina D1 es característica del LCM, también puede encontrarse en otras neoplasias hematológicas como algún subtipo de mieloma, la tricoleucemia y en algún otro caso de Linfoma Difuso de Célula B Grande (26-28).

2.2 Linfoma Difuso de Célula B Grande

El Linfoma Difuso de Célula B Grande constituye el 25-30% de los linfomas No-Hodgkin de los adultos. Se caracteriza por ser una neoplasia constituida por linfocitos B maduros, de tamaño grande (más del doble de un linfocito normal) con un patrón de crecimiento difuso. Este tipo de linfoma es un grupo heterogéneo con diferentes subgrupos morfológicos, inmunofenotípicos y moleculares. Se le considera como un linfoma clínicamente agresivo pero potencialmente curable (36).

2.2.1 Linfoma Difuso de Célula B Grande Características

En el Linfoma Difuso de Célula B Grande (LDCBG) se observa morfológicamente una proliferación e infiltración difusa de los tejidos por células linfoides grandes, que generalmente alteran totalmente la estructura del ganglio, aunque también puede observarse una infiltración parcial interfolicular ó sinusoidal. Las variantes morfológicas más frecuentes son: centroblástica, inmunoblástica y anaplástica. Inmunofenotípicamente las células tumorales expresan en su superficie marcadores de linfocitos B maduros y suelen demostrar restricción de una cadena ligera. La expresión de CD5, CD10, BCL2, BCL6 y IRF4/MUM1 es variable. Generalmente no se observa sobreexpresión de la proteína Ciclina D1 (36).

Usando una combinación de anticuerpos para los marcadores CD10 ó CALLA (antígeno común de la leucemia linfoblástica aguda, common acute lymphoblastic leukemia antigen en inglés), BCL6 (proteína 6 del linfoma de células B, B-cell lymphoma 6 protein en inglés) y IRF4/MUM1 (Factor regulador de Interferón 4/Mieloma Múltiple1, Interferon regulatory factor 4/Multiple myeloma oncogene 1 en inglés) el LDCBG inmunofenotípicamente se subdivide en dos subtipos: el subtipo inmunofenotípicamente similar al centro germinal B (GCB en inglés) y un subtipo no-centro germinal B (non-GCB en inglés) (36-38).

IRF4/MUM1 es un factor de transcripción expresado en células plasmáticas y en los estadios finales de diferenciación de células B mientras que BCL6 y CD10 son marcadores de las células B centro germinales. CD10 es una molécula adherida a la membrana, que normalmente se expresa en células inmaduras Pre B en la médula ósea. La expresión de CD10 se pierde en las células linfoides B naive pero vuelve a ser reexpresada en las células B de los centro germinales. BCL6 es un importante factor de transcripción y ambas moléculas son necesarias para la formación del centro germinal B.

Se considera que los casos de LDCBG con expresión inmunohistoquímicamente positiva solo de CD10, expresión positiva de tanto CD10 y BCL6 y casos BCL6 positivos, CD10 negativos e IRF4/MUM1 también negativo, son del tipo inmunofenotípico centro germinal B (GCB). Las otras combinaciones como la expresión exclusiva de IRF4/MUM1, la expresión de ambos IRF4/MUM1 y BCL6 ó la negatividad de los tres marcadores, son combinaciones consideradas como del subtipo no-centro germinal B (non-GCB) (36,37).

Utilizando microarrays de ADN, el LDCBG se ha subdividido molecularmente en dos subgrupos: tipo centro germinal B (GCB-like) y tipo célula B activada (ABC-like) (39). Las células del LDCBG subtipo GCB-like presentan el perfil de expresión genética característico de las células B normales del centro germinal B y generalmente se asocian con un pronóstico favorable. Mientras que los LDCBG del subtipo ABC-like presentan una expresión genética normalmente inducida *in vitro* de células B periféricas activadas y se asocian a un peor pronóstico (39).

A parte de la subdivisión del LDCBG en los subtipos inmunofenotípicos de subtipo GCB y un subtipo non-GCB, al LDCBG también se le ha reconocido un subtipo inmunofenotípico de

LDCBG CD5 positivo (36). El diagnóstico diferencial de estos LDCBG CD5 positivos es con el LCM de las variedades morfológicas blastoide y pleomórfica. Estos casos pueden ser difíciles de diagnosticar y diferenciar. Varios grupos han estudiado la expresión de Ciclina D1 en LDCBG encontrando que hasta un 15% de LDCBG expresan Ciclina D1 aunque la inmensa mayoría de los casos no presentaban la $t(11;14)(q13;q32)$ (26,40). Esta dificultad diagnóstica indica la necesidad de encontrar nuevos marcadores específicos del LCM, para poder diferenciar las variedades morfológicas blastoide y pleomórfica del LDCBG Ciclina D1 positivo.

2.3 Diferenciación de los Linfocitos B

Ante la presencia de patógenos y antígenos, el sistema inmune requiere que las células linfoides B naive maduren rápidamente a células plasmáticas capaces de producir anticuerpos y linfocitos B de memoria. Este proceso se realiza en un ambiente muy especializado: en el centro germinal del folículo linfoide de los ganglios linfáticos y en ocasiones se observa también en tejidos extra-ganglionares.

2.3.1 Células Linfoides B naive

En las zonas corticales de los ganglios linfáticos, se encuentran localizados los folículos linfoides primarios, compuestos por células linfoides B naive. Estas células corresponden a linfocitos B maduros derivados de las células precursoras B de la médula ósea, que ya han realizado su diferenciación antígeno independiente. El proceso de diferenciación de las células precursoras B produce un amplio espectro de receptores antigénicos ó BCR. Este proceso se realiza mediante la recombinación de los segmentos VDJ de los genes de la región variable de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas (*IGHV*). Una vez realizada la recombinación de las cadenas pesadas y ligeras de las inmunoglobulinas, los linfocitos B abandonan la médula ósea.

Las células linfoides B naive morfológicamente corresponden a linfocitos de pequeño tamaño, con núcleos redondos de densa cromatina y escaso citoplasma. Muestran en su superficie marcadores de linfocitos B maduros, aunque algunas expresan el marcador de los

linfocitos T CD5 y las inmunoglobulinas de superficie IgM y IgD. No expresan TdT, CD10 ó CD34. Estos últimos son marcadores de las células precursoras B. Cada célula linfoides B naive está comprometida a expresar una cadena ligera de las inmunoglobulinas, que puede ser la cadena ligera Kappa ó Lambda. Las células linfoides B naive de la zona del manto de los folículos linfoides secundarios, expresan también IgM y IgD y algunas coexpresan CD5, al igual que las células linfoides B naive del folículo linfoide primario (41).

La estimulación antigénica de los folículos primarios crea unas estructuras altamente organizadas: los folículos linfoides secundarios con la corona de células del manto, centros germinales B y una densa red de células dendríticas foliculares (41).

2.3.2 Centros Germinales B

Los centros germinales B son estructuras muy especializadas en las cuales se realiza la respuesta inmune dependiente de los linfocitos T. A la vez, los centros germinales B, sostienen la expansión proliferativa de clones de células B antígeno activadas y la inducción de la hipermutación somática de los genes de las inmunoglobulinas (38,41). Los genes de las inmunoglobulinas también son inducidos a los cambios de clase de las cadenas pesadas. Los centros germinales B crean un microambiente que permite la selección de clones células B antígeno activadas con un receptor antigénico de alta afinidad. Estas células B antígeno seleccionadas y diferenciadas, saldrán del centro germinal B convirtiéndose en células memoria B y células plasmáticas (41).

Morfológicamente el centro germinal B está principalmente formado por dos compartimentos: la zona oscura y la zona clara. La zona oscura se compone principalmente de centroblastos (células B de tamaño mediano a grande, con un núcleo vesicular oval a redondo que contiene nucléolos cercanos a la membrana nuclear). También están presentes en la zona oscura los centrocitos (células B más pequeñas con núcleos irregulares, a veces muy indentados, cromatina densa y nucléolos poco evidentes). Acompañando estas dos poblaciones se observan macrófagos, cuya función es fagocitar la debris nuclear apoptótica.

La zona clara de los centros germinales B, contiene principalmente centrocitos inactivos y una alta concentración de células dendríticas foliculares, presentadoras de antígenos (38,41).

En la zona oscura, los centroblastos sufren el fenómeno de la hipermutación somática (Somatic Hypermutation SHM) en los genes de la región variable (IgV) de las cadenas pesadas y ligeras de las inmunoglobulinas. Este proceso permitirá seleccionar células B que expresan receptores con una alta afinidad para reconocer un antígeno específico. A medida que maduran los centroblastos, se convierten en centrocitos, que se acumulan en la zona clara del centro germinal B. Estos centrocitos también serán sometidos a la recombinación con cambios de clase de los genes de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas (Class Switch Recombination CSR), cambiando de inmunoglobulinas IgM ó IgD a las inmunoglobulinas clases IgG, IgA ó IgE. Los centrocitos, cuyas mutaciones de los genes de las inmunoglobulinas, hayan resultado en receptores antigénicos con menor afinidad, entraran rápidamente en apoptosis, siendo fagocitados por macrófagos y dando lugar al patrón de cielo estrellado (Figura 7) (38,41,42). En cambio los centrocitos cuyas mutaciones de los genes de las inmunoglobulinas, hayan resultado en receptores antigénicos con una mayor afinidad, serán capaces de unirse a antígenos no procesados de las células dendríticas foliculares y recibirán señales de supervivencia (38,41,42).

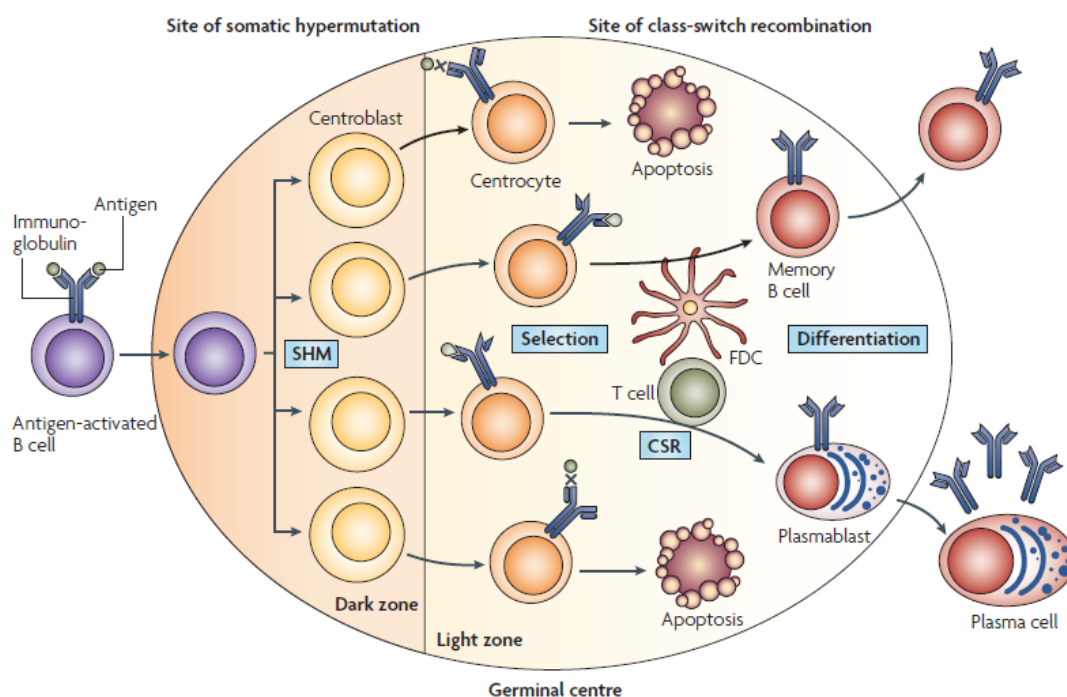


Figura 7. Esquema del microambiente del Centro Germinal. Las células B antígeno activadas se convierten en centroblastos, que son sometidos a una expansión clonal en la zona oscura del centro germinal. En la zona oscura se realiza la hipermutación somática SHM de los genes de las regiones variables IgV de las cadenas pesadas y ligeras de las inmunoglobulinas. Los centroblastos se diferencian a centrocitos, moviéndose hacia la zona clara del centro germinal. En esta zona clara, con la ayuda de linfocitos T y las células dendríticas foliculares, los receptores antigénicos modificados con mayor afinidad antigénica, son seleccionados, mientras que los centrocitos con receptores antigénicos desfavorables entran en apoptosis. Un subgrupo de centrocitos también tendrá cambio de clase de las inmunoglobulinas CSR. Klein *et al.* (38).

Los centrocitos serán capaces de procesar el antígeno y presentarlo a los linfocitos T dentro de la zona clara del centro germinal B. Los linfocitos T colaboradores CD4 positivos activados, expresarán el ligando a CD40 y se unirán a la molécula CD40 que se expresa en la superficie de los linfocitos B. Las interacciones en la superficie del linfocito B, tanto del antígeno con el receptor antigénico como de la molécula CD40, rescatarán a las células B del proceso de apoptosis. Tras estos procesos de selección en los centro germinales B, las células de memoria B antígeno específicas, dejarán los folículos linfoides secundarios y se podrán detectar en sangre periférica y en la zona marginal de los ganglios o el bazo. Las células plasmáticas en cambio irán hacia la médula ósea y otras zonas ricas en células plasmáticas como son los cordones medulares de los ganglios linfáticos y la pulpa roja esplénica (38,41,42).

2.3.3 IRF4/MUM1;BLIMP1, PAX5 y XBP1

Varios cambios inmunofenotípicos importantes ocurren durante la diferenciación de las células B desde el centro germinal hacia células memoria B y células plasmáticas. Uno de estos cambios es la modulación de la expresión de la proteína anti-apoptótica BCL2 (Proteína 2 del linfoma de células B, B-cell lymphoma 2 protein en inglés). BCL2 es una proteína expresada en las células linfoides B naive y células de memoria B pero no en los linfocitos del centro germinal que con este cambio inmunofenotípico, son más susceptibles a entrar en apoptosis y solo sobrevivirán los clones que sean rescatados por la aparición de BCR altamente seleccionados (41).

Tanto los centroblastos como los centrocitos expresan marcadores de linfocitos B maduros y los marcadores de los centros germinales B BCL6 y CD10 (38,41,42).

BCL6 es un factor de transcripción esencial para la formación, mantenimiento de los centros germinales B y la respuesta inmune dependiente de las células T. Además la función de BCL6 es prevenir la diferenciación plasmática prematura y así permitir unas eficientes SHM y CSR durante la fase del linfocito B en el centro germinal. La maduración de células B centro germinales hacia células memoria B y células plasmáticas requiere la supresión de la expresión de BCL6, la cual se consigue a través de varios mecanismos en los estadios finales del programa del centro germinal B, mediante las acciones de los factores de transcripción IRF4/MUM1 y BLIMP1 (Figura 8) (38,41,42).

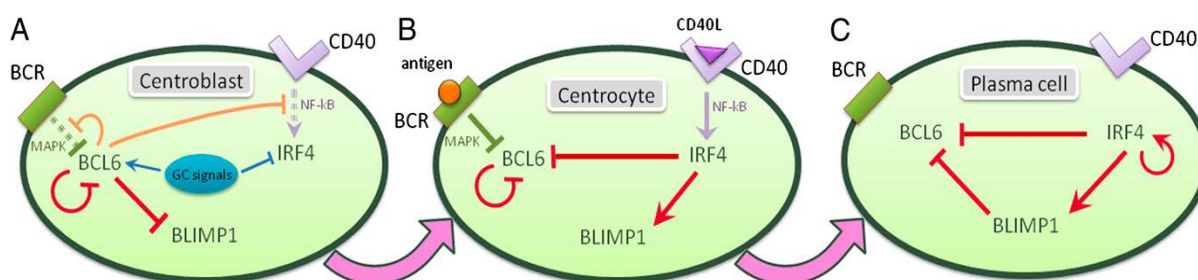


Figura 8. Esquema de regulación de los Centros Germinales B. Durante la fase del centroblasto se promueve la expresión de BCL6, potente represor transcripcional que controla el programa regulador del centro germinal B. BCL6 directamente bloquea BLIMP1. En la fase del centrocito, las células B compiten por señales de supervivencia a través de BCR y las células T, lo cual lleva a la degradación de la proteína BCL6 y la regulación en alza de IRF4/MUM1. En la fase de la célula plasmática, BLIMP1 y IRF4/MUM1 se expresan y contribuyen al silenciamiento transcripcional de BCL6. La célula plasmática se encuentra bloqueada en esta fase de diferenciación terminal mediante un bucle de retroalimentación positivo de IRF4/MUM1. Martínez *et al.* (42).

2.3.4 BLIMP1

BLIMP-1 (Proteína de maduración inducida por linfocitos B 1, B lymphocyte-induced maturation protein 1 en inglés) es una proteína de 98 kDa, codificada por el gen *PRDM1* que funciona como un represor transcripcional. Su expresión es característica en células B con diferenciación terminal y células plasmáticas, pues es un factor de transcripción esencial para la regulación del proceso de diferenciación de las células B a células plasmáticas. También juega un papel importante en la secreción de inmunoglobulinas (42,43).

2.3.5 IRF4/MUM1

El oncogén *IRF4/MUM1* es un gen activado transcripcionalmente por la t(6;14)(p25,q32) que se observa en 65% de los mielomas múltiples. La t(6;14)(p25;q32) causa la yuxtaposición del gen de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas *IgH* al oncogén *1 del mieloma múltiple*. El producto del oncogén *IRF4/MUM1* es una proteína de 50 kDa que actúa como factor de transcripción, que reprime BCL6 y forma parte de la familia de los factores regulatorios del Interferón.

La proteína IRF4/MUM1 es además un factor de transcripción esencial en el desarrollo de las células plasmáticas. El oncogén *IRF4/MUM1* puede inactivarse por mutaciones y deleciones. En estudios experimentales con ratones deficientes de IRF4 (*IRF4^{-/-}*) en los cuales este gen se convierte en no-funcionante, no se observa linfocitos B o T activados o células plasmáticas, lo cual sugiere que IRF4/MUM1 es esencial para el desarrollo linfoide (44,45,46). BCL6, IRF4/MUM1 y BLIMP1 interaccionan entre sí a través de complejos mecanismos moleculares. Tanto IRF4/MUM1 como BLIMP1 son importantes inductores de la diferenciación plasmática, al contrario de BCL6.

Un mecanismo importante de la supresión de la expresión de BCL6 es la inducción de IRF4/MUM1 a través de células T que estimulan la vía NF-κB (vía del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas, nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells en inglés) a través de CD40, molécula de superficie de los linfocitos B. IRF4/MUM1 induce también la activación del factor de transcripción BLIMP1. A su vez, BCL6 previene la diferenciación plasmática de células B centro germinales, a través de represión de la transcripción de *PRDM1*, el gen codificador de BLIMP1. En cambio BLIMP1 contribuye a la supresión del factor de transcripción BCL6, al unirse con su promotor. En las células plasmáticas, IRF4/MUM1 se une a su propio promotor, dando lugar a un mecanismo positivo auto regulador por el cual, las células plasmáticas pueden mantener un nivel alto de expresión de IRF4/MUM1 (38,41,42,47).

2.3.6 PAX5

La diferenciación plasmática requiere la regulación en alza de los factores de transcripción IRF4/MUM1 y BLIMP1 y a su vez la inactivación de PAX5 (Proteína de caja apareada 5,

Paired Box protein 5 en inglés). PAX5 es un factor de transcripción esencial en la diferenciación de las células progenitoras linfoides a células de línea B y mantiene activamente la identidad de las células B. PAX5 y BCL6 cooperan para mantener el fenotipo centro germinal B. La supresión de PAX5 es necesaria para la aparición de células plasmáticas. BLIMP1 puede eficientemente suprimir el programa de expresión genética de la célula B y promover la salida del ciclo celular al suprimir los genes de factores de transcripción importantes como PAX5. BLIMP1 al reprimir la expresión de PAX5 y BCL6 permite la diferenciación plasmática. Al mismo tiempo BLIMP1 estimula la transcripción de XBP1 (Proteína fijadora de la caja X 1, X-box binding protein 1 en inglés). XBP1 es necesario para el fenotipo secretor de las inmunoglobulinas de la célula plasmática terminalmente diferenciada. A su vez, XBP1 es reprimido por PAX5 (38,41,42,47-50).

2.3.7 XBP1

El factor de transcripción XBP1 es esencial tanto para la diferenciación plasmática como para la respuesta a proteínas desplegadas (Unfolded Protein Response UPR, en inglés). UPR es una respuesta al estrés celular que se activa en presencia de una acumulación de proteínas desplegadas o mal plegadas en el lumen del retículo endoplasmático y que tiene como objetivo recuperar el funcionamiento normal de la célula. La activación del UPR también ocurre durante la diferenciación plasmática pues el retículo endoplasmático está marcadamente expandido en células B activadas para manejar el incremento de producción y secreción de las inmunoglobulinas. El acumulo de inmunoglobulinas desplegadas induce también la transcripción del ARNm del gen *XBP1*. Por tanto XBP1 es esencial para el proceso de la diferenciación plasmática, pues su ausencia conlleva a un acúmulo de inmunoglobulinas desplegadas y en consecuencia a la apoptosis celular (47,51,52).

2.3.8 Células Plasmáticas

Las células plasmáticas son las células derivadas de los linfocitos B, cuya función principal consiste en la secreción de anticuerpos. Morfológicamente presentan un núcleo excéntrico redondo o oval con cromatina densa, con la característica forma de "rueda de carro" y un abundante citoplasma basófilo. Las células plasmáticas presentan una expansión muy importante del retículo endoplásmico; esta expansión permite a las células plasmáticas la secreción de copiosas cantidades de inmunoglobulinas (38,41,53,54).

La célula precursora a la célula plasmática madura es el plasmoblasto, esta célula conserva todavía actividad proliferativa, pero pierde el marcador PAX5, factor de transcripción esencial para mantener las células linfoides de línea B. Los plasmoblastos pierden también marcadores de linfocitos B maduros como el CD20. Tras el plasmoblasto, las células terminaran su diferenciación convirtiéndose en las células plasmáticas maduras que han perdido su capacidad de proliferación, pero son capaces de secretar grandes cantidades de inmunoglobulinas (Figura 9) (38).

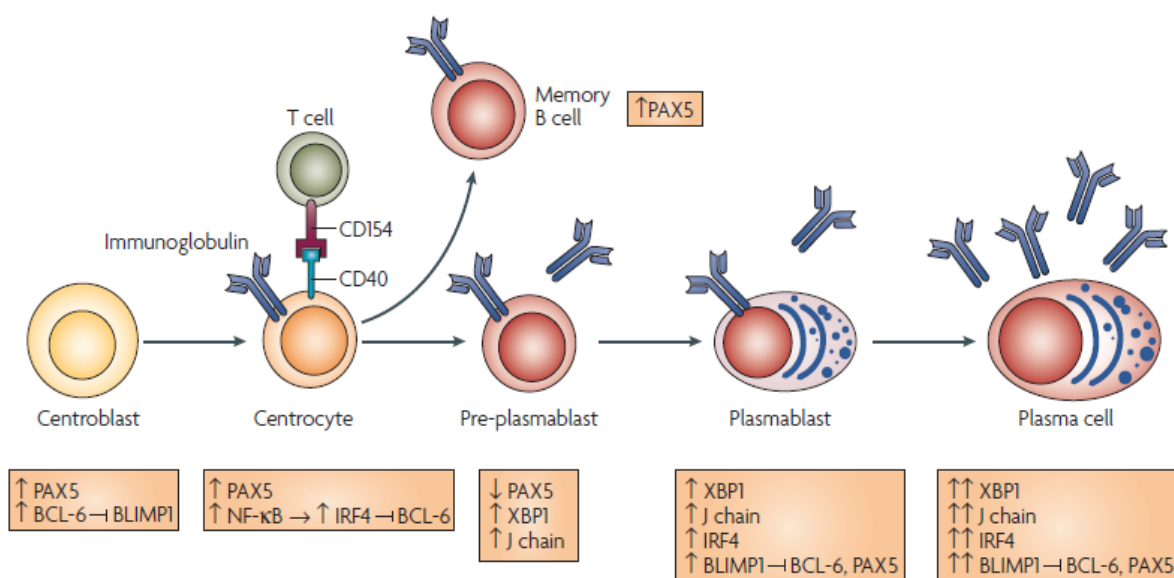


Figura 9. Esquema del desarrollo post Centro Germinal de la célula B. La estimulación de CD40 mediada por células T conlleva a la represión de BCL6 a través de IRF4/MUM1. Se produce la inactivación de PAX5 y en los estadios pre-célula plasmática se empieza a observar una secreción de inmunoglobulinas a través de la expresión de los genes de XBP1 y la cadena IgJ. La regulación en alza de BLIMP1 y IRF4/MUM1 durante la fase del plasmoblasto, establece el característico fenotipo de la célula plasmática y BLIMP1 reprime la expresión de PAX5 en plasmoblastos y células plasmáticas.

En cambio la continua expresión de PAX5 en las células memoria B, mantiene su identidad como linfocitos B. BCL6 y BLIMP1 establecen un mutuo bucle de supresión entre centroblasto y plasmoblasto/célula plasmática respectivamente. Klein *et al.* (38)

Las células plasmáticas maduras son un grupo de células heterogéneas que se dividen principalmente en dos subgrupos: células plasmáticas maduras de corta o larga vida (41,55). En vivo, las células plasmáticas pueden desarrollarse a través de dos rutas diferentes: una vía extra folicular y otra a través de los centros germinales B. La vía extra folicular representa una vía independiente de las células T, que genera células plasmáticas de corta vida, productoras de la inmunoglobulina IgM. Este anticuerpo tiene una afinidad menor hacia los antígenos, que los anticuerpos producidos a través de la vía dependiente de las células T. No se generan células memoria B a través de la vía extra folicular.

En cambio, las células plasmáticas generadas a través de la vía del centro germinal B, son células de larga vida cuya diferenciación ha sido dependiente de las células T. Representan células plasmáticas que han sufrido recombinación y cambio de clase de los genes de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas (CSR), cambiando de inmunoglobulina IgM a las inmunoglobulinas clases IgG, IgA ó IgE (38,41,55).

Las células plasmáticas maduras emigran hacia los cordones medulares de los ganglios linfáticos, la pulpa roja esplénica y la médula ósea; aunque las células plasmáticas generadas en el tejido linfóide asociado al intestino o ganglios linfoides mesentéricos, no suelen emigrar hacia ganglios linfáticos periféricos o a la médula ósea (41,55).

Las células plasmáticas maduras pierden la inmunoglobulina de superficie, los marcadores de linfocitos B y la molécula CD40; en cambio las inmunoglobulinas se acumulan en el citoplasma. Inmunofenotípicamente las células plasmáticas expresan CD38 y CD138 (syndecan) y los factores de transcripción BLIMP1, XBP1 y IRF4/MUM1 mientras que el factor de transcripción PAX5 desaparece (Figura 10) (41,55).

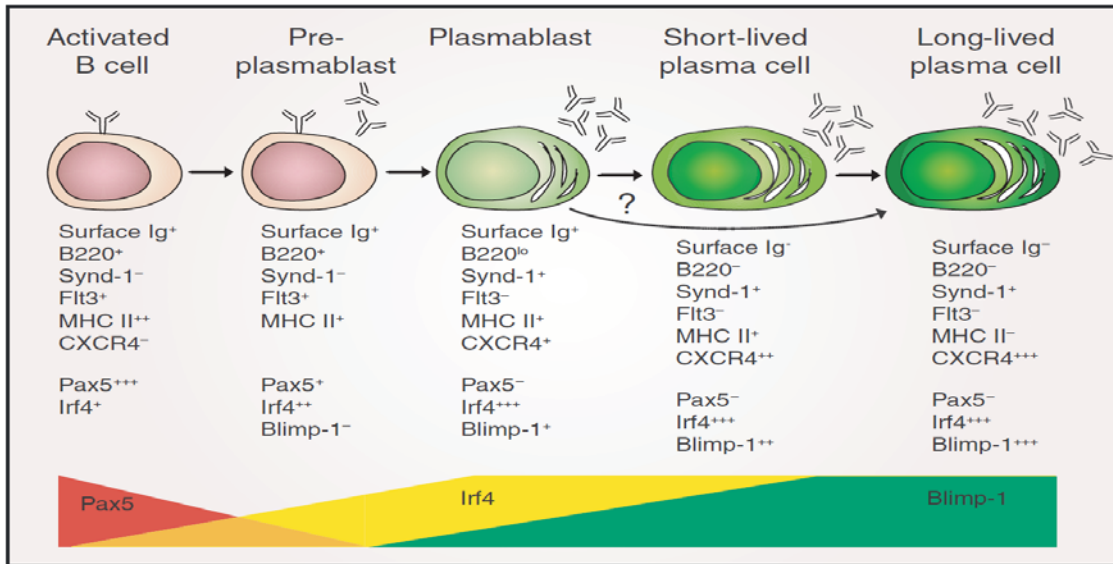


Figura 10. Expresión de marcadores de superficie y de factores de transcripción durante el desarrollo de la célula plasmática. Oracki *et al.* (55).

La sobreexpresión de XBP1 induce muchos cambios fenotípicos en la célula plasmática que le ayudan a incrementar su maquinaria secretora para poder manejar el aumento de secreción de inmunoglobulinas. Esto se puede observar al comprobar que las células aumentan de tamaño y su citoplasma presenta un extenso y aumentado retículo endoplasmático (51,52).

2.4 Factor de Transcripción SOX11

2.4.1 Familia de genes SOX

Los genes de la familia SOX (SRY related HMG box: Sex-determining región in Chromosome Y related High Mobility Group box) son un grupo aproximadamente de 20 genes en los vertebrados; de los cuales el primero en ser identificado fue SRY (Sex determining región in Chromosome Y) en 1990 (56,57). A medida que se fueron descubriendo los otros genes de esta familia, se les fue sub clasificando en 8 grupos A-H; en relación a la similitud que guardaban entre sí en su región HMG box (56,57). Estudios recientes han descubierto que las proteínas de la familia SOX actúan como factores de transcripción que se unen con el ADN e interaccionan con otras proteínas a través de su

región HMG box y funcionan como activadores y represores de transcripción (56). Las proteínas de la familia SOX están involucradas en importantes funciones tales como la determinación y desarrollo del sexo masculino, desarrollo embrionario del ectodermo, la cresta neural y endodermo, la angiogénesis, cardiogénesis y desarrollo del esqueleto (56).

2.4.2 Factor de Transcripción SOX11

El grupo C de la familia de los genes SOX está constituido por tres genes. *SOX4*, *SOX11* y *SOX12*, de los cuales los dos primeros son los más conocidos. El gen *SOX11* fue descubierto en 1995 y está ubicado en el cromosoma 2p25 (58). Se expresa intensamente durante la organogénesis de fetos humanos y de ratón, en los tejidos del sistema nervioso, pulmón, intestino, páncreas, bazo, riñón, gónadas y mesenquimal, pero no se expresa normalmente en los tejidos adultos. La proteína generada por el gen *SOX11* se compone de 441 aminoácidos con un peso molecular de 46,7 kDa; está constituida de dos dominios funcionales: la región HMG box (SOX) de unión al ADN localizada en la mitad N-terminal y el dominio de transactivación (TAD) localizado en la porción C-terminal de la proteína (57-59). *SOX11* está implicado en la regulación de la supervivencia de la célula neuronal y se expresa intensamente en tumores malignos del sistema nervioso central y algunos tumores sólidos (60,61).

2.4.3 SOX11 y Linfoma de Células del Manto

La posible función de *SOX11* en la linfopoyesis no se conoce ya que aparentemente, no se expresa en las células progenitoras linfoides ni en células B maduras normales (60). Por el contrario, entre las neoplasias linfoides tiene una expresión relativamente selectiva en el LCM, de forma que se considera como un marcador de diagnóstico muy específico para este tipo de linfoma, incluidos los casos Ciclina D1 negativos. *SOX11* también se puede expresar en la tricoleucemia, linfoma de Burkitt y neoplasias linfoides inmaduras (29-32).

La posible implicación de *SOX11* en el curso clínico agresivo del LCM se sugirió inicialmente al observar que *SOX11* era uno de los genes intensamente expresado en los LCM que requerían tratamiento en el momento del diagnóstico, en comparación con aquellos linfomas que tenían un curso clínico indolente (Figura 11 y 12) (62).

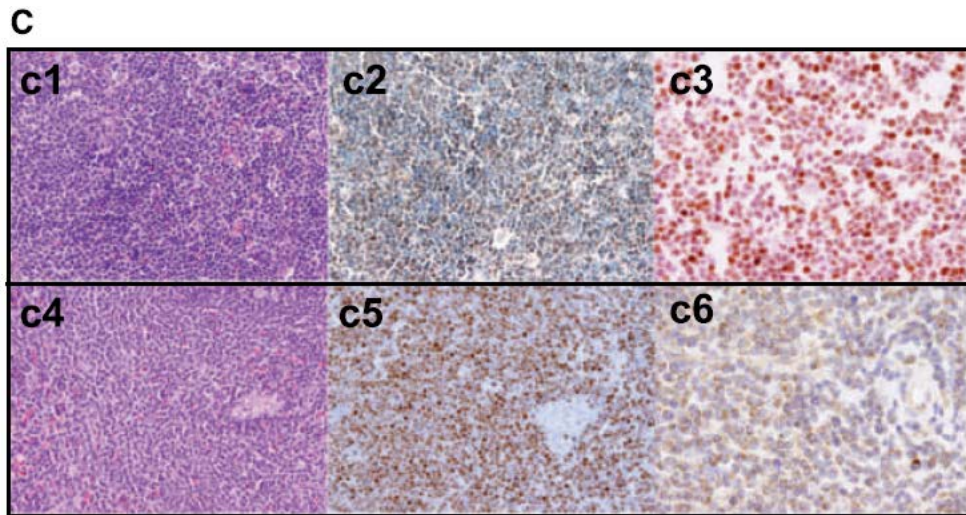


Figura 11. Análisis inmunohistoquímico de SOX11 en LCM. El LCM convencional (c1,c2,c3) demuestra la tinción H&E (c1), expresión de Ciclina D1 (c2) y una intensa expresión nuclear de SOX11 (c3). En cambio, el LCM indolente (c4,c5,c6) es positivo para Ciclina D1 (c5) pero los núcleos de las células tumorales son negativos para SOX11 (c6). Fernandez *et al.* (62).

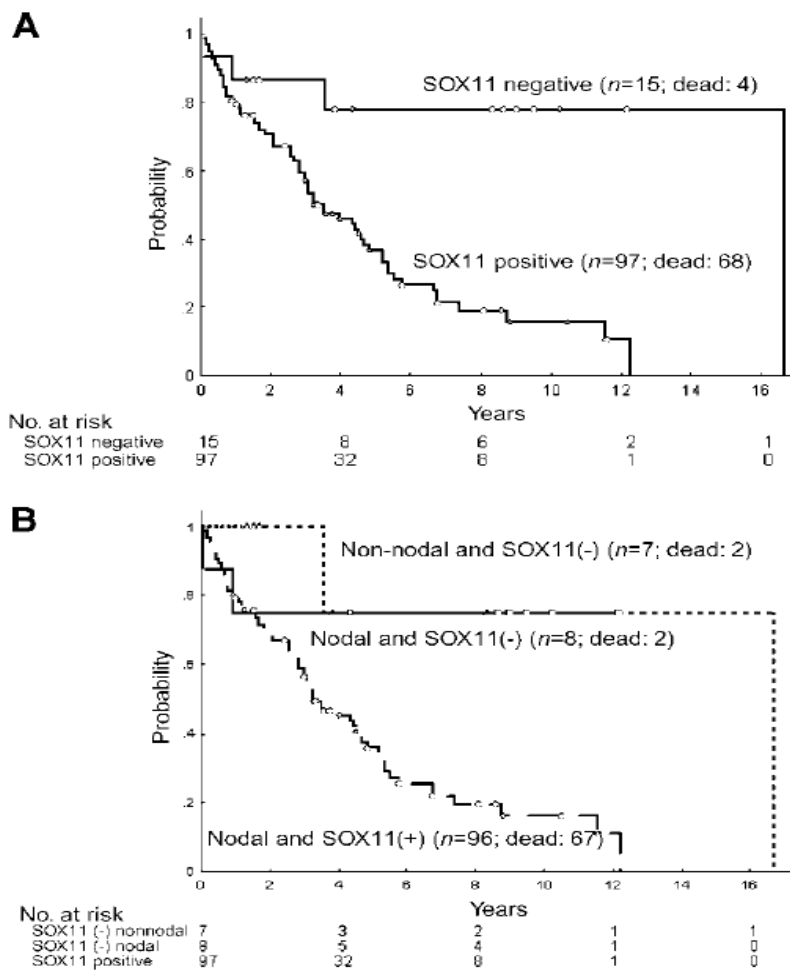


Figura 12. Curva de Kaplan- Meier de la supervivencia global de 112 pacientes con LCM.

A) validación de las series en relación a la expresión de SOX11 ($p < 0.001$). B) Supervivencia global en relación a la presentación nodal y no-nodal y la expresión de SOX11 ($p = 0.05$). Fernandez *et al.* (62).

La relación entre la ausencia de la expresión de SOX11 y el curso clínico indolente del LCM se confirmó en estudios posteriores aunque también se observó un curso clínico agresivo en LCM SOX11 negativos, pero la mayoría de estos casos presentan mutaciones del gen *TP53* (63-65).

El potencial oncogénico de SOX11 ha sido confirmado experimentalmente en estudios de silenciamiento de SOX11 (SOX11-knockdown studies) donde se observó una significativa reducción de crecimiento tumoral *in vivo* en líneas celulares xenoinjertadas de LCM en comparación con las líneas celulares SOX11-positivas (Figura 13) (60,66). Además estudios recientes experimentales han demostrado que LCM SOX11 positivo presenta sobreexpresión de genes angiogénicos y tienen una mayor densidad microvascular en comparación con LCM SOX11 negativos, que puede explicar su mayor potencial agresivo (61).

Los mecanismos oncogénicos de SOX11 en la limfomagénesis del LCM no son completamente conocidos, aunque como previamente se ha mencionado, parece que existen dos subtipos moleculares diferentes de LCM y la expresión de SOX11 varía en estos dos subtipos (1). Se postula que el subtipo más frecuente es SOX11 positivo y proviene de células con la $t(11;14)(q13;q32)$ que colonizan la zona del manto de los ganglios creando lesiones *In Situ* y presentan limitadas mutaciones somáticas de la región *IGHV*. Estos casos son genéticamente inestables, tienen tendencia a acumular alteraciones en genes desregulando el ciclo celular, alterando mecanismos de respuesta al daño del ADN y mecanismos de supervivencia celular. Alternativamente el subtipo menos frecuente de LCM proviene de células con la $t(11;14)(q13;q32)$ pero son SOX11 negativos. Las células pueden entrar en el centro germinal B y sufrir hipermutaciones somáticas de la región *IGHV*. Estas células son genéticamente estables y el LCM de este subtipo suelen afectar con más frecuencia la sangre periférica y el bazo (1,33).

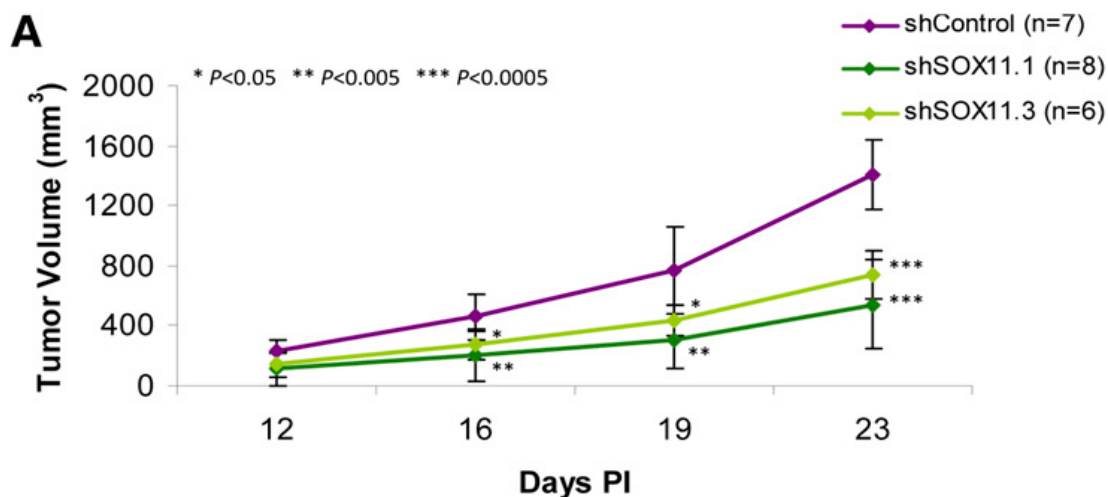


Figura 13. Crecimiento tumoral *in vivo* con líneas celulares injertadas de LCM. Estudio experimental con líneas celulares presentando silenciamiento de SOX11, demostrando una reducción del crecimiento tumoral (volumen tumoral mm³) en ratones injertados con líneas celulares de LCM SOX11 negativo. Vegliante *et al.*(60).

En estudios recientes se ha indicado que *PAX5* es uno de los genes directamente regulado por SOX11 en líneas celulares de LCM (60). Como previamente mencionado, *PAX5* es un importante factor de transcripción, esencial en la diferenciación de las células progenitoras linfoides a células de línea B manteniendo su identidad. La aparición de células plasmáticas necesita la supresión de *PAX5*. El silenciamiento de SOX11 en líneas celulares de LCM, resulta en una reducción de la expresión de *PAX5* y consecuentemente un incremento de la expresión de *BLIMP1* y *XBP1*.

BLIMP1 y *XBP1* son dos factores de transcripción esenciales para la diferenciación plasmática. En resumen, en este estudio experimental, se observó que el silenciamiento de SOX11 en líneas celulares de LCM conlleva a un cambio en la expresión del perfil genético y del perfil fenotípico, desde un patrón de expresión de genes y fenotipo de célula B madura a célula con diferenciación plasmática inicial (Figura 14) (60).

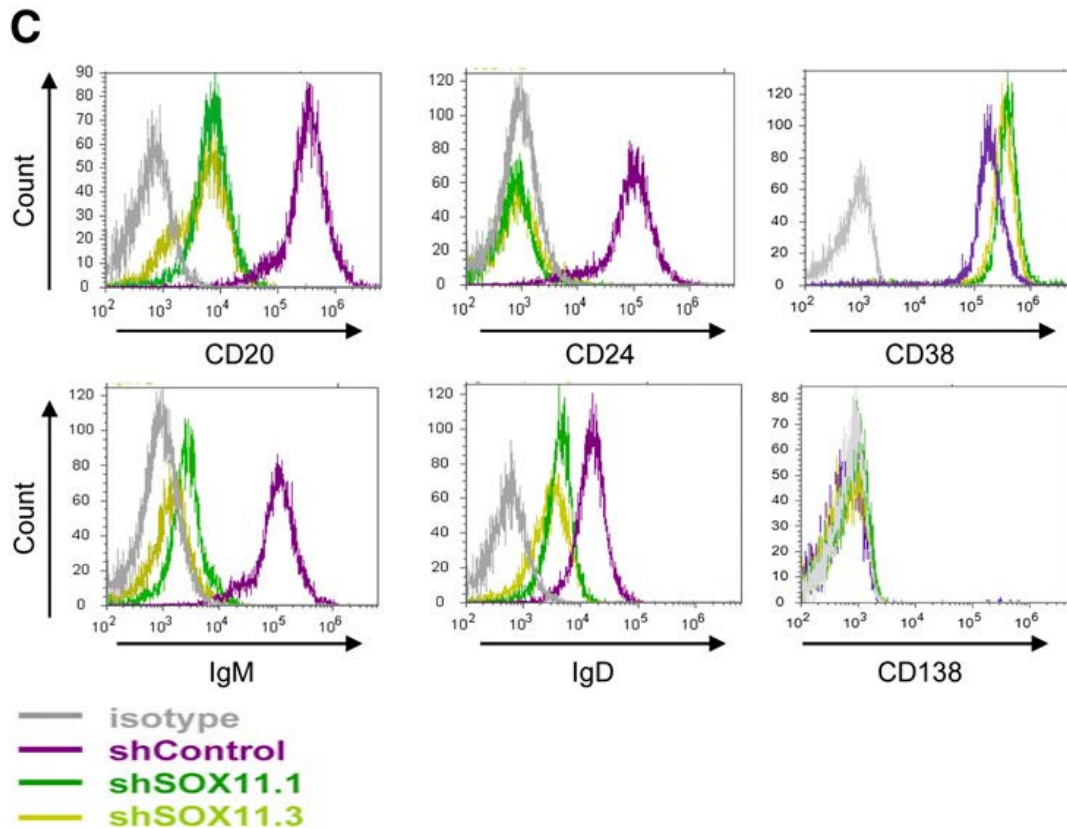


Figura 14. SOX11 activa genes específicos de la célula B y reprime el programa genético de la célula plasmática. Histogramas con la expresión de marcadores superficiales de célula B (CD20,CD24), célula plasmática (CD38 y CD138), IgM y IgD en shControl, shSOX11.1 y shSOX11.3 de la línea celular Z138. Se observó una reducción de la expresión de los marcadores superficiales de células B (CD20 y CD24) IgD y IgM, en las células con silenciamiento de SOX11. El marcador plasmático de superficie CD38 se expresó en las células de control y tan solo fué marginalmente sobreexpresado en las células con silenciamiento, mientras que la expresión de CD138 (marcador de célula plasmática con diferenciación completa y terminal) no fué detectable en ninguno de los diferentes grupos. Vegliante *et al.*(60).

Estos resultados indican y sugieren que SOX11 puede contribuir a la limfomagénesis del LCM bloqueando el programa de diferenciación terminal de las células B. Sin embargo se desconoce si en LCM primario, la expresión de SOX11 puede modular las características morfológicas e inmunofenotípicas de la diferenciación terminal de la célula B.

Hipótesis y Objetivos

3. Hipótesis y Objetivos

En esta Tesis hemos trabajado fundamentalmente con **2 Hipótesis y 2 Objetivos Principales**. La primera hipótesis se ha estudiado en el Manuscrito I mientras que la segunda hipótesis se ha investigado en el Manuscrito II de esta Tesis.

3.1.1 Primera Hipótesis Manuscrito I

El diagnóstico diferencial entre el LDCBG Ciclina D1 positivo y el LCM variantes pleomórfica o blastoide tiene dificultades. Se necesita encontrar nuevos marcadores específicos que ayuden en esta distinción. El uso de SOX11 inmunohistoquímicamente puede ser útil. Nuestra hipótesis es que LDCBG Ciclina D1 positivo no expresa inmunohistoquímicamente la proteína nuclear del factor de transcripción SOX11, ni tiene tampoco la t(11;14)(q13;q32).

3.1.2 Primer Objetivo Principal

Por tanto, nuestro objetivo principal en el Manuscrito I es demostrar que el estudio inmunohistoquímico con SOX11 y el estudio de la t(11;14)(q13;q32) por FISH puede ser de utilidad en el diagnóstico diferencial entre estos dos tipos diferentes de linfomas.

3.1.3 Objetivo Adicional

El LDCBG Ciclina D1 positivo es un linfoma B poco frecuente y difícil de diagnosticar. Por tanto nuestro segundo objetivo en el Manuscrito I es estudiar la frecuencia de este tipo de linfoma y sus características clínico patológicas.

3.2.1 Segunda Hipótesis Manuscrito II

El LCM está compuesto característicamente por una población monótona linfoide atípica sin diferenciación plasmocelular. Algunos estudios han demostrado casos de LCM con diferenciación plasmocelular. Nuestra hipótesis es que estos casos son SOX11 negativos. También postulamos que los casos de LCM SOX11 negativos presentarán más frecuentemente un inmunofenotipo con diferenciación plasmocelular y que la diferenciación plasmocelular se asociará a una conducta clínica mas indolente.

3.2.2 Segundo Objetivo Principal

Nuestro objetivo principal en el Manuscrito II es demostrar que LCM primario SOX11 negativo se asocia más frecuentemente a un inmunofenotipo con diferenciación plasmocelular.

3.2.3. Objetivo Adicional

El objetivo adicional del Manuscrito II es demostrar que el LCM primario SOX11 negativo con diferenciación plasmática también se asocia a un curso clínico más indolente.

Manuscritos realizados, Material, Métodos y Resultados

La descripción de los diferentes casos de Linfoma así como la metodología utilizada en los trabajos presentados en esta Tesis, se encuentran detalladamente descritas en las secciones de “Material and Methods” de cada uno de los dos artículos que componen esta Tesis.

Dichos artículos se incluyen en esta sección tal y como han sido publicados en la literatura científica médica.

4.1 Manuscrito I

4.1.1 Manuscrito I: Datos

Título: SOX11 is useful in differentiating cyclin D1-positive diffuse large B-cell lymphoma from mantle cell lymphoma

Autores: Shih-Chuan Hsiao, Inmaculada Ribera Cortada, Luis Colomo, Hongtao Ye, Hongxiang Liu, Szu-Yin Kuo, Shu-Hui Lin, Sheng-Tsung Chang, Ted U Kuo, Elias Campo, Shih-Sung Chuang

Datos:

Revista: Histopathology (Reino Unido)

Factor de Impacto (2015): 3.453

Cuartil: 1er cuartil Patología

Referencia: Histopathology. 2012;61:685-93.

PMID: 22642745

4.1.2 Resumen:

Objetivos: caracterizar la frecuencia y las características clínico patológicas del Linfoma difuso de célula B grandes Ciclina D1 positivo y la utilidad de SOX11 en el diagnóstico diferencial con el Linfoma de células del Manto.

Métodos y Resultados: Retrospectivamente teñimos 206 Linfomas difusos de células B grandes consecutivos para Ciclina D1 e identificamos tres casos (1,5%) positivos. Dos de estos de pacientes tenían edad avanzada. Los tres casos compartían el mismo fenotipo de célula B no centro germinal (CD5-, CD10-, BCL6+, MUM1+ y SOX11-), negatividad al virus de Epstein-Barr y la ausencia de aberraciones de *CCND1* por hibridación fluorescente in situ. El tercer caso presentaba reordenamientos de BCL6 y MYC: un Linfoma Double Hit.

Al mismo tiempo, se identificaron 22 Linfomas de células del Manto, todos expresando Ciclina D1 con 89% de los casos expresando SOX11, una frecuencia que es estadísticamente significativa en relación al Linfoma difuso de célula B grandes Ciclina D1 positivo. Interesantemente identificamos un Linfoma de células del Manto pleomórfico inicialmente diagnosticado como Linfoma difuso de célula B grande. Una cohorte separada de 98 Linfomas difusos de célula B grandes resulto negativa para SOX11, con solo un caso Ciclina D1 positivo con fenotipo centro germinal (CD10+, BCL6+, MUM1-).

Conclusiones: Linfomas difusos de células B grandes Ciclina D1 positivos son poco frecuentes y son negativos para SOX11 o aberraciones de *CCND1*. SOX11 es útil en la diferenciación entre Linfoma difuso de célula B grande Ciclina D1 positivo y Linfoma de célula del Manto.

SOX11 is useful in differentiating cyclin D1-positive diffuse large B-cell lymphoma from mantle cell lymphoma

Shih-Chuan Hsiao, Inmaculada Ribera Cortada,¹ Luis Colomo,¹ Hongtao Ye,² Hongxiang Liu,³ Szu-Yin Kuo,⁴ Shu-Hui Lin,⁴ Sheng-Tsung Chang,⁴ Ted U Kuo,⁵ Elias Campo¹ & Shih-Sung Chuang^{4,6}

Department of Hemato-Oncology, St Martin de Porres Hospital, Chia-Yi, Taiwan, ¹Department of Pathology, Hospital Clinic, University of Barcelona, Barcelona, Spain, ²Department of Histopathology, Royal National Orthopaedic Hospital, University College London, London, ³Molecular Malignancy Laboratory and Department of Histopathology, Addenbrooke's Hospital, Cambridge University Hospitals NHS Foundation Trust, Cambridge, UK, ⁴Department of Pathology, Chi-Mei Medical Centre, Tainan, ⁵Department of Pathology, St Martin de Porres Hospital, Chia-Yi, and ⁶Department of Pathology, Taipei Medical University, Taipei, Taiwan

Date of submission 25 November 2011
Accepted for publication 24 January 2012

Hsiao S-C, Cortada I R, Colomo L, Ye H, Liu H, Kuo S-Y, Lin S-H, Chang S-T, Kuo T U, Campo E & Chuang S-S (2012) *Histopathology*

SOX11 is useful in differentiating cyclin D1-positive diffuse large B-cell lymphoma from mantle cell lymphoma

Aims: To characterize the frequency and clinicopathological features of cyclin D1-positive diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) and the usefulness of SOX11 in the differential diagnosis from mantle cell lymphoma (MCL).

Methods and results: We retrospectively stained 206 consecutive DLBCLs for cyclin D1, and identified three (1.5%) positive cases, comprising two in the elderly with necrosis, and a third with a starry-sky pattern. All three cases shared the same non-germinal centre B-cell (non-GCB) phenotype [CD5-/CD10-/bcl-6+/MUM1+/SOX11-], Epstein-Barr virus (EBV) negativity, and absence of *CCND1* aberrations by fluorescence *in-situ* hybridization. The third case showed both *BCL6* and *MYC* rearrangements: a

double-hit lymphoma. In the same period there were 22 MCLs, all expressing cyclin D1, with 89% cases expressing SOX11, a frequency that is statistically different from cyclin D1-positive DLBCL. Notably, we identified a pleomorphic MCL initially misdiagnosed as DLBCL. A separate cohort of 98 DLBCL cases was negative for SOX11, with only one case expressing cyclin D1 with a GCB phenotype (CD10+/bcl-6+/MUM1-). The two patients with tumour necrosis rapidly died of disease. The other two were in complete remission after immunochemotherapy.

Conclusions: Cyclin D1-positive DLBCLs are rare, and they are negative for SOX11 or *CCND1* aberration. SOX11 is useful in differentiating cyclin D1-positive DLBCL from MCL.

Keywords: *CCND1*, cyclin D1, diffuse large B-cell lymphoma, double-hit lymphoma, mantle cell lymphoma

Abbreviations: BL, Burkitt lymphoma; DLBCL, diffuse large B-cell lymphoma; EBER, Epstein-Barr virus-encoded mRNA; EBV, Epstein-Barr virus; FISH, fluorescence *in-situ* hybridization; GCB, germinal centre B-cell; IPI, International Prognostic Index; MCL, mantle cell lymphoma; R-CHOP, rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine and prednisolone; RT, Richter transformation; SOX11, sex-determining region Y-box 11; WHO, World Health Organization

Address for correspondence: S-S Chuang, Department of Pathology, Chi-Mei Medical Centre, 901 Chung-Hwa Road, Yung-Kang District, Tainan City 710, Taiwan. e-mail: cmh5301@mail.chimei.org.tw

© 2012 Blackwell Publishing Limited.

Introduction

Cyclin D1 is a nuclear protein that is up-regulated by reciprocal translocation involving *CCND1/PRAD1* (or *BCL1*) on chromosome 11q13 and *IGH* on chromosome 14q32. It is expressed in the great majority of mantle cell lymphomas (MCLs), but rarely in other haematopoietic neoplasms, except for a proportion of plasma cell neoplasms and hairy cell leukaemias.^{1–5} Cyclin D1 expression in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), the most common type of lymphoma, is rare, with only a few single-case reports and small case series in the literature, except for a very recent series of 17 cases.^{6–11} These cases may pose diagnostic challenges, and are difficult to differentiate from MCL, particularly from rare morphological variants such as the pleomorphic type. Sex-determining region Y-box 11 (SOX11) is a neural transcription factor, and its nuclear expression has been found to be highly specific for MCLs, as it is rarely expressed in other haematopoietic neoplasms.^{12–14}

We encountered an index case of cyclin D1-positive DLBCL in a consultation service, and subsequently conducted a retrospective study of consecutive DLBCLs, using immunohistochemistry for cyclin D1 in a single institution in Taiwan. SOX11 staining was performed in MCLs and cyclin D1-positive DLBCLs. We also undertook genotypic analysis of cyclin D1-expressing DLBCLs using fluorescence *in-situ* hybridization (FISH). A separate Spanish cohort of 98 DLBCLs was stained for cyclin D1 and SOX11.

Materials and methods

We retrospectively searched the departmental lymphoma database of Chi-Mei Medical Centre, Tainan, Taiwan from January 2005 to December 2010 for DLBCLs and MCLs. The Institutional Review Board approved this study. Specimens were fixed in 10% formalin, processed using routine methods, and embedded in paraffin. All of the original haematoxylin and eosin (H&E)-stained and/or newly cut and H&E-stained sections were reviewed. Immunohistochemical stains were performed for each case, using either the labelled streptavidin–biotin peroxidase method (LSAB kit; Dako, Carpinteria, CA, USA) or a polymer-based detection system (Bond Polymer Refine Detection; Vision BioSystems, Newcastle Upon Tyne, UK), and an antigen-retrieval technique was applied where needed for each antibody. The antibodies used were CD3, CD5, CD20, CD21, bcl-2, bcl-6, IRF4/MUM1 (MUM1p), Ki67 (MIB-1) (DakoCytomation, Glostrup, Denmark), CD10 (Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK), CD43 (BioGe-

nex, San Ramon, CA, USA), SOX11 (Atlas Antibodies, Stockholm, Sweden), and cyclin D1 (clone SP4; Thermo Scientific, Runcorn, UK). Appropriate controls were used for all stains. We defined cyclin D1 positivity as $\geq 10\%$ tumour cells showing nuclear expression. The Taiwanese series was reviewed by two haematopathologists (S.S.C. and S.T.C.), and the Spanish series was reviewed by three haematologists (I.R.C., L.C., and E.C.). *In-situ* hybridization for Epstein–Barr virus (EBV)-encoded mRNA (EBER) was performed in an autostainer (Bond MAX; Vision BioSystems, Mount Waverley, Australia), with a polymer-based detection system (Bond Polymer Refine Detection; Vision BioSystems, Newcastle Upon Tyne, UK), an EBV-specific probe (Bond ISH EBER Probe), and 3,3'-diaminobenzidine as chromogen. In addition, we performed an immunohistochemical study for SOX11 (Atlas Antibodies) and cyclin D1 (antibody clone, SP4) in a separate cohort of 98 Spanish DLBCLs, including 88 in tissue microarrays and 10 with whole tissue sections.

Locus-specific interphase FISH was performed on paraffin-embedded tissue sections of thickness 4 μm , as previously described,¹⁵ with dual-colour break-apart rearrangement probes for *MYC*, *IGH*, *BCL2*, *BCL6* and *CCND1* loci, and dual-colour dual fusion translocation probes for *IGH/MYC* and *IGH/CCND1* (Vysis/Abbott Laboratories, Maidenhead, UK).

Results

In the study period, a total of 181 in-house cases were initially diagnosed as DLBCL. In our routine diagnostic practice at Chi-Mei Medical Centre, Tainan, Taiwan, cyclin D1 immunostaining has been included in the panel for DLBCLs since January 2008. All DLBCLs from January 2005 to December 2007 were retrospectively stained for cyclin D1. Of the 181 cases from 2005 to 2010, three were positive for cyclin D1, including one case that was initially diagnosed in 2005 as DLBCL, and then re-categorized as pleomorphic MCL after additional immunohistochemical study and pathological review. This misdiagnosed MCL showed expression of CD5, CD20, bcl-2, cyclin D1 and SOX11, but not of CD3, CD10, CD43, bcl-6, or MUM1. Excluding this misdiagnosed case, the prevalence of cyclin D1 expression in in-house Taiwanese DLBCLs was 1.1% (two of 180 cases). During this study period, there was a total of 19 in-house MCLs, including the aforementioned case with a revised diagnosis. In the same period, there were 56 and three cases of DLBCL and MCL, respectively, in the consultation service (to S.-S.C.). Of the 26 DLBCLs with available tissue for retrospective staining for

cyclin D1, one case (3.8%), i.e. the index case, showed a positive result. On compilation of the in-house and consultation cases, the prevalence of cyclin D1 expression was 1.5% (three of 206 cases).

Table 1 lists the pertinent clinical features of four cases of cyclin D1-positive DLBCL, including the three aforementioned Taiwanese cases and one Spanish case identified in the separate cohort. The Taiwanese cases were one male and two females; two were 78 years old and the third was 43 years old. In addition to lymphadenopathy, case 1 also had malignant pleural effusion, as confirmed by cytological examination. All three patients had advanced Ann Arbor stage with elevated serum lactate dehydrogenase level and either high (cases 1 and 2) or high-intermediate risk (case 3) International Prognostic Index (IPI) scores. The two patients with high-risk IPI scores were briefly treated with chemotherapy, and mainly with supportive care; they both died of progressive disease shortly thereafter. The third patient, with a high-intermediate-risk IPI score, was in complete remission after six courses of immunochemotherapy with rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine and prednisolone (R-CHOP).

Histological examination revealed diffuse architectural effacement in all three cases, with focal tumour necrosis in the first two cases (Figure 1) and a focal starry-sky pattern in the third case (Figure 2). Morphologically, the neoplastic cells were classified as anaplastic in case 1 and as centroblastic in cases 2 and 3, with an admixed minor component of immunoblasts in case 2. Table 2 lists the immunophenotypic profiles. All three Taiwanese cases shared the same immunophenotype, with expression of CD20, bcl-2, bcl-6, and MUM1, but not of CD3, CD5, CD10, CD43, or SOX11, a non-germinal centre B-cell (non-GCB) phenotype by the algorithm of Hans *et al.*¹⁶ Cyclin D1 was expressed in 60%, 30% and 50% of neoplastic cells in cases 1, 2, and 3, respectively. No follicular dendritic meshworks

were detected by immunostaining with anti-CD21 antibody. EBER was negative in all three cases.

Table 2 lists the FISH results. Both cases 1 and 2 were negative for *BCL2*, *BCL6*, *IGH*, *MYC* and *CCND1* rearrangement or copy number changes. The neoplastic cells of case 3 were positive for *BCL6* (Figure 2E), *MYC* and *IGH* rearrangement by dual-colour break-apart rearrangement probes. A *IGH/MYC* dual-colour dual-fusion probe confirmed the reciprocal translocation between *IGH* and *MYC* loci (Figure 2F). Dual-colour break-apart rearrangement probes for *BCL2* and *CCND1* and dual-colour dual-fusion probes for *IGH/CCND1* and *IGH/BCL2* showed no structural or numerical changes at the target loci in this case (Figure 2G).

During the study period there was a total of 19 (3.4%) in-house MCLs among 558 cases of malignant lymphoma, comprising 35 (6.3%) Hodgkin lymphomas and 523 (93.7%) non-Hodgkin lymphomas. The prevalence of MCL among non-Hodgkin lymphomas was 3.6% (19/523). In a total of 22 MCLs in this period, including the three cases from the consultation service, the growth patterns were nodular in 19 and diffuse in three. The cellular morphology was classical in 18 (82%) cases, small cell in two cases, pleomorphic in one case, and mixed small and pleomorphic in the remaining case (Figure 3). All 22 cases were positive for cyclin D1. The immunostaining for SOX11 was unsatisfactory in three cases. In the remaining 19 evaluable cases, 17 (89%) expressed SOX11, including 10, two and five cases with strong, moderate and weak reactivity, respectively. The two cases with the small-cell variant of MCL were the only cases negative for SOX11. Although the number of cyclin D1-positive DLBCLs was small, the difference in SOX11 expression rate between these cases and MCLs was statistically significant ($P = 0.006$, Fisher's exact test). Both the initially misdiagnosed MCL case with pleomorphic cytomorphology and the case with a mixture of small and

Table 1. Pertinent clinical data of cyclin D1-positive diffuse large B-cell lymphomas from Taiwan (cases 1–3) and Spain (case 4)

Case no./sex/age	Bx organ	Stage	LDH	PS	IPI	Treatment	FU (months)
1/M/78	LN	IVA	Elevated	4	5	Rituximab, vincristine, prednisolone	DOD (1)
2/F/78	LN	IVB (fever)	Elevated	4	5	Cyclophosphamide	DOD (0.5)
3/F/43	LN	IIIA	Elevated	2	3	R-CHOP ×6	NED (13)
4/M/56	LN	IIA	Normal	0–1	1	R-CHOP ×4, R/T	NED (89)

Bx, Biopsy; DOD, died of disease; F, female; FU, follow-up; IPI, International Prognostic Index; LDH, lactate dehydrogenase; M, male; LN, lymph node; NED, no evidence of disease; PS, Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status; R-CHOP, rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine and prednisolone; R/T, radiotherapy.

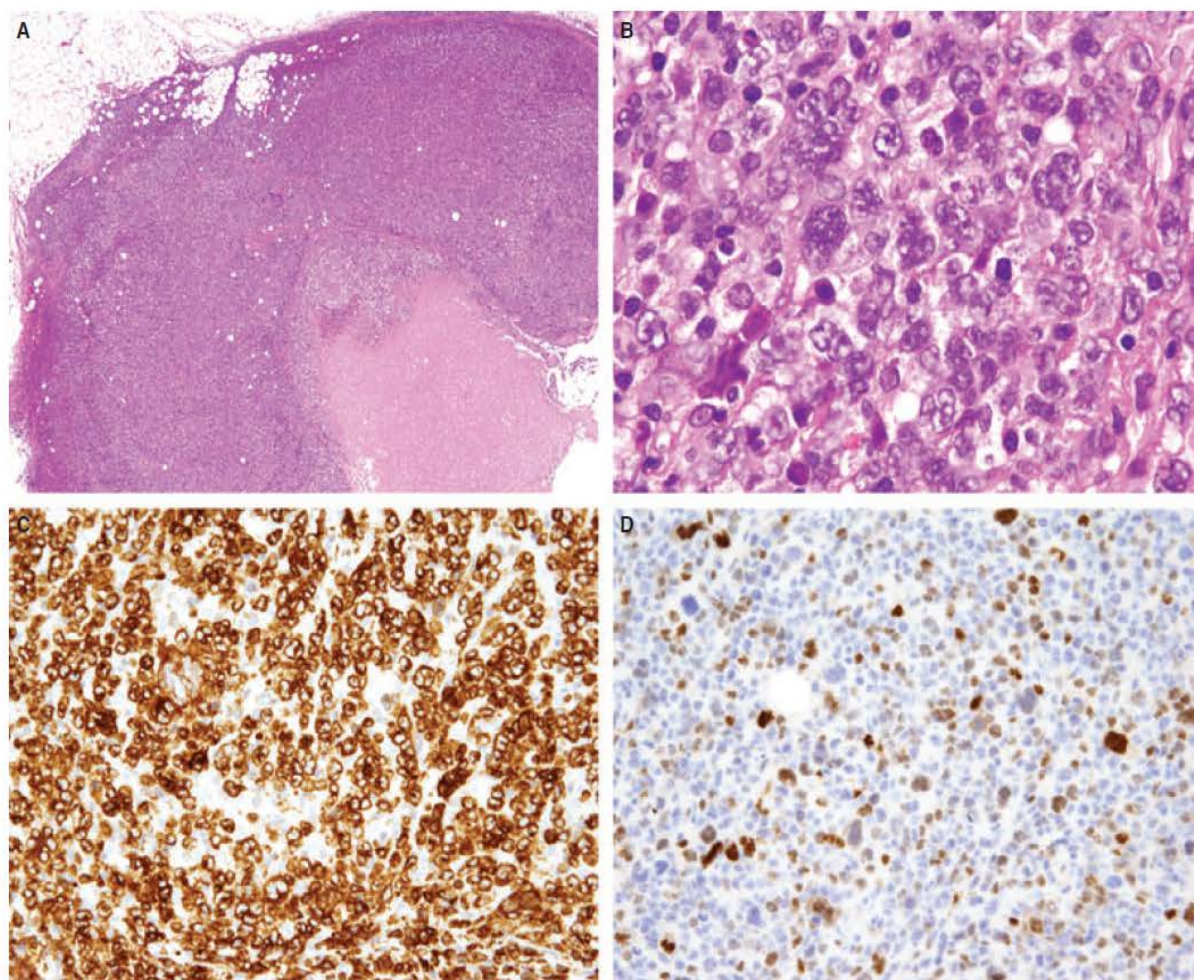


Figure 1. Cyclin D1-positive diffuse large B-cell lymphoma, Case 1. A, Low-power photomicrograph of the lymph node shows diffuse lymphocytic infiltration with focal necrosis in the right lower quadrant. B–D, High-power photomicrographs show anaplastic large cells (B) diffusely expressing bcl-2 (C) and partially expressing cyclin D1 (D). The fluorescence *in-situ* hybridization assay was negative for *CCND1* rearrangement (not shown).

pleomorphic cells were positive for *CCND1* translocation by FISH.

In the separate cohort of 98 Spanish cases of DLBCL, all were negative for SOX11, with only one case (1%) expressing cyclin D1 in 10% of cells. The clinical, immunophenotypic and FISH findings of this case are listed as case 4 in Tables 1 and 2. This 56-year-old male patient was diagnosed through a cervical lymph node biopsy. His stage IIA disease was in complete remission for 89 months after four courses of R-CHOP and radiotherapy. The phenotype of this tumour was distinct from that of the three Taiwanese cases in the expression of CD10 and absence of bcl-2 and MUM1, a GCB phenotype according to the algorithm of Hans *et al.*¹⁶ It was also negative for CD5, CD43, and SOX11. FISH assay revealed *BCL6* rearrangement, but not *MYC*, *BCL2*,

IGH, *CCND1*, or *MALT1*. The immunophenotype (CD5–/CD10+/CD43–/bcl-6+/SOX11–) and rearranged *BCL6* but not *IGH* or *CCND1* strengthened our argument that this case was a DLBCL rather than a MCL, and that SOX11 is useful in differentiating cyclin D1-positive DLBCL from MCL.

Discussion

SOX11 is a neural transcription factor, expression of which has been found in the great majority of MCLs but rarely in other B-cell lymphomas, with the exception of some cases of lymphoblastic lymphoma and Burkitt lymphoma (BL).^{12–14} Cyclin D1-positive DLBCL is very rare, and only two cases have been screened for SOX11 expression in the literature, both of which were negative.^{9,11} In our study of Taiwanese cases, we

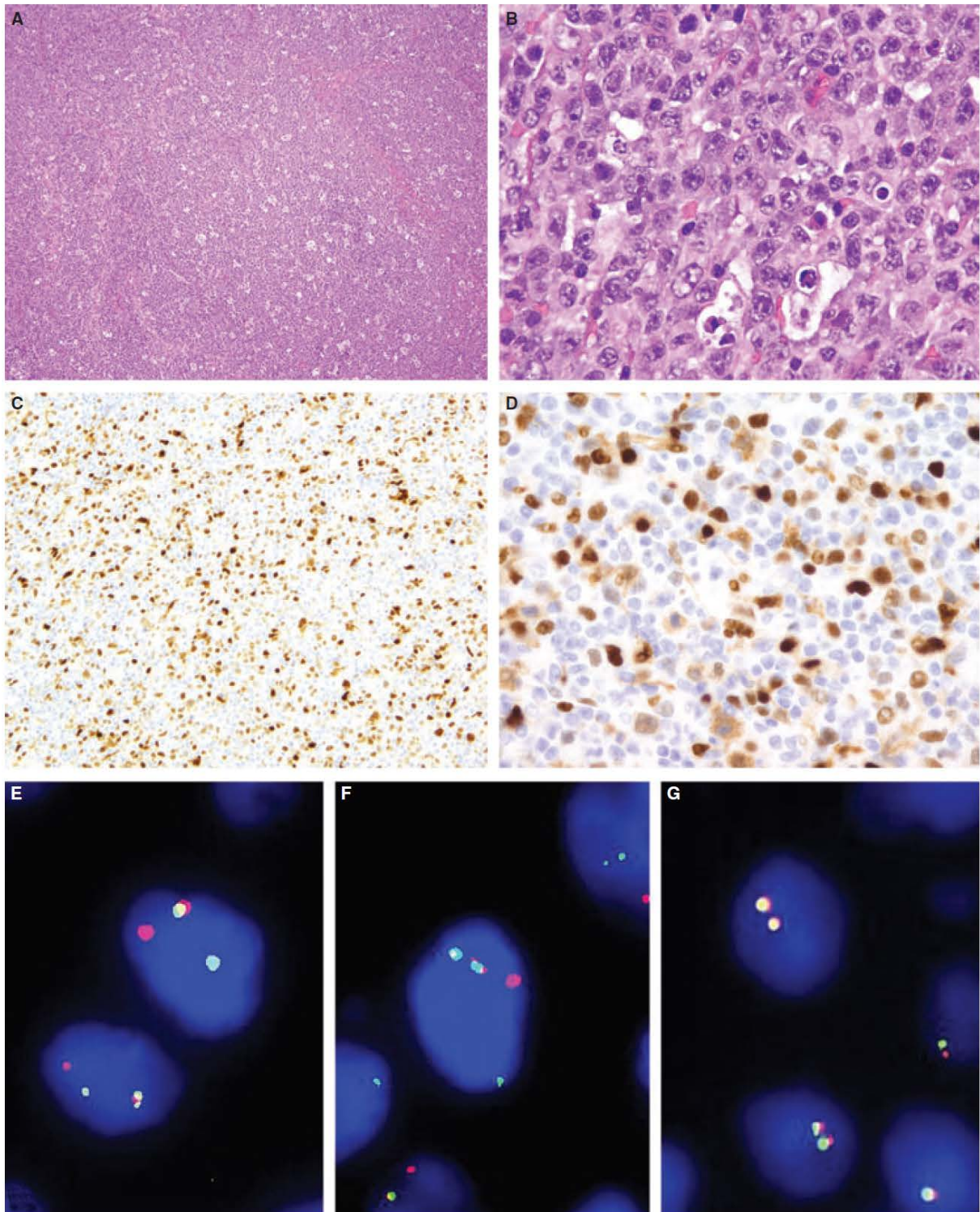
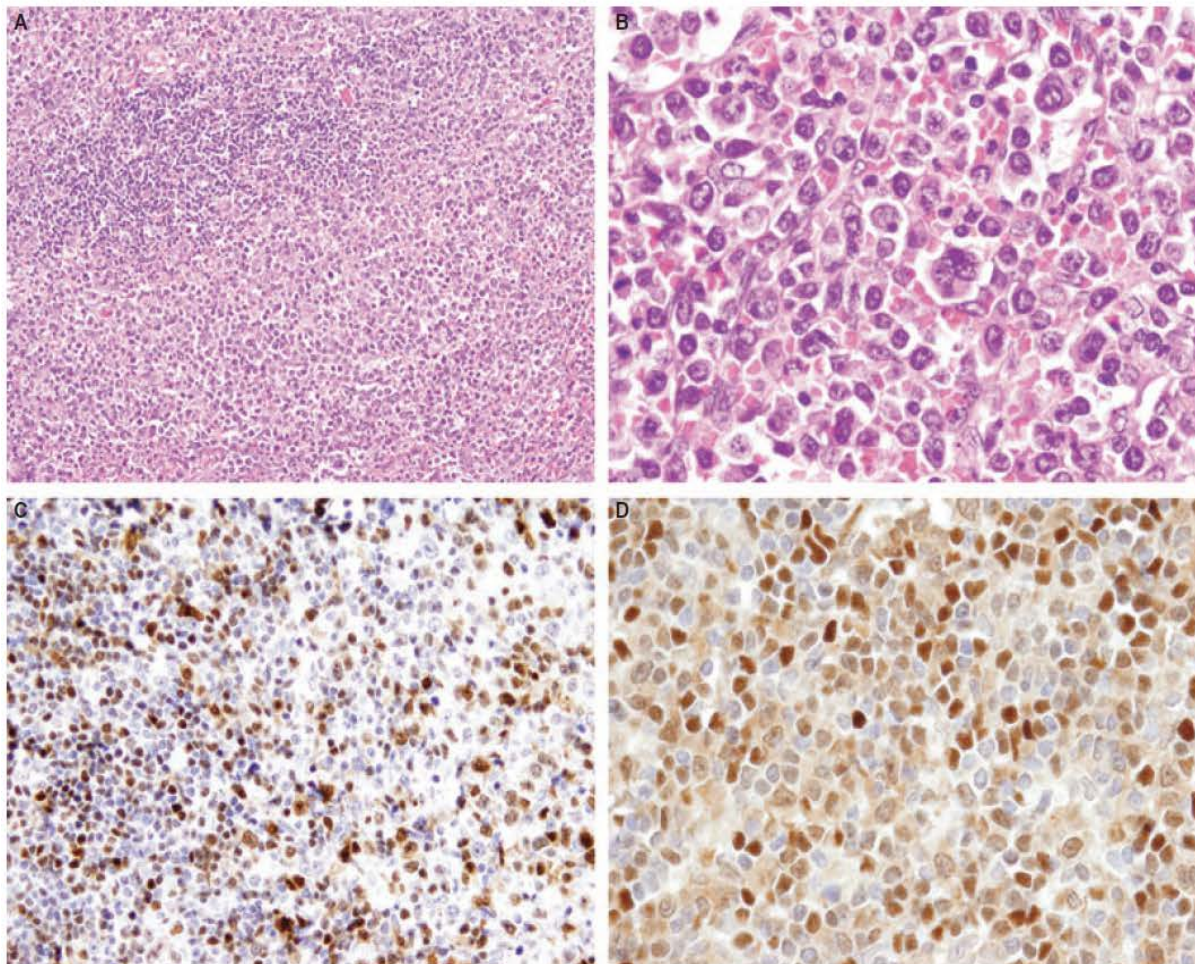


Figure 2. Cyclin D1-positive diffuse large B-cell lymphoma. Case 3. **A**, Low-power photomicrograph of the lymph node shows diffuse nodal atypical lymphocytic infiltration with a starry-sky pattern (H&E). **B**, High-power view reveals large tumour cells with vesicular nuclei and frequent mitoses, and a few benign histiocytes with phagocytosis of the nuclear debris (H&E). **C,D**, Approximately 30% of tumour cells express cyclin D1 (immunohistochemistry). **E**, Fluorescence *in-situ* hybridization (FISH) with a *BCL6* dual-colour break-apart probe reveals one red and one green colocalization signal, one red signal and one green signal in each cell, indicating *BCL6* rearrangement. **F**, FISH with a *IGH/MYC* dual-colour dual-fusion probe shows two red and two green colocalization signals, one red signal and one green signal, indicating *IGH/MYC* reciprocal translocation. **G**, FISH with *CCND1* dual-colour break-apart probes reveals two red and two green colocalized signals in each cell, indicating no *CCND1* rearrangement or numerical changes.

Table 2. Immunophenotypic and fluorescence *in-situ* hybridization (FISH) findings of cyclin D1-positive diffuse large B-cell lymphomas from Taiwan (cases 1–3) and Spain (case 4)

Case no.	Immunohistochemistry								FISH						
	CD5	CD10	CD43	bcl-2	bcl-6	MUM1	SOX11	Cyclin D1	<i>BCL2</i>	<i>BCL6</i>	<i>IGH</i>	<i>MYC</i>	<i>IGH/ MYC</i>	<i>CCND1</i>	<i>IGH/ CCND1</i>
1	-	-	-	+	+	+	-	+ (60%)	-	-	-	-	ND	-	ND
2	-	-	-	+	+	+	-	+ (30%)	-	-	-	-	ND	-	-
3	-	-	-	+	+	+	-	+ (50%)	-	+	+	+	+	-	-
4	-	+	-	-	+	-	-	+ (10%)	-	+	-	-	ND	-	-

ND, Not done.

**Figure 3.** Mantle cell lymphoma with cytomorphology of mixed small and pleomorphic cells. **A.** Medium-power photomicrograph of the spleen shows mixed small cells (left upper quadrant) and medium to large cells. **B.** High-power view shows pleomorphic tumour cells, including a giant cell with multinucleation. **C.** Cyclin D1 expression in both small cells (left-hand side) and medium to large pleomorphic cells. **D.** SOX11 expression in neoplastic cells. Fluorescence *in-situ* hybridization assay with an *IGH/CCND1* fusion probe shows the presence of translocation in both the small-cell and large-cell components (not shown).

found that all three cyclin D1-positive DLBCLs were negative for SOX11; in contrast, 89% of MCLs expressed this nuclear protein during the same study period. Although the case numbers of cyclin D1-positive DLBCLs stained for SOX11 are small (two in the literature and four in our series, including the Spanish case), they are invariably negative, as compared with the high frequency of SOX11 expression in MCL.^{12–14}

We fully characterized the three cases of DLBCL from Taiwan showing cyclin D1 expression, and found that they accounted for only 1.5% of DLBCLs. In the separate Spanish cohort, the expression rate was similarly low, at 1.0%. Rodriguez-Justo *et al.*⁶ reported the first case of cyclin D1-positive DLBCL. In that report, the authors investigated cyclin D1 expression in a large series of aggressive B-cell lymphomas, and found that all 114 DLBCLs and 32 BLs, including atypical BLs, were negative. Metcalf *et al.*¹⁷ reported cyclin D1 expression in only four (2.0%) of 204 cases of DLBCL, but not in any other lymphoma type. On the other hand, Ehinger *et al.*⁷ reported a relatively high incidence of cyclin D1 expression among CD5-negative DLBCLs (4.3%; 10 of 231 cases). In that study, the cyclin D1 staining intensity was weak in nine cases, which was similar to that of hairy cell leukaemia, in which there was no *CCND1* gene rearrangement.¹ The only case with strong reactivity carried a t(11;14) translocation, and the tumour was composed of centroblasts, indicating that this was most likely a blastoid MCL rather than a DLBCL. Unfortunately, there were no genetic data on *MYC*, *BCL2* or *BCL6* loci for this case. Vela-Chavez *et al.*¹⁰ also reported a high frequency of cyclin D1 expression: 15% (10 of 66 cases) of unselected *de-novo* DLBCLs, and 18% (two of 11 cases) of chronic lymphocytic leukaemia with Richter transformation (RT). Seven additional cases of cyclin D1-positive DLBCL (six *de novo* and one RT) were included in this study. The majority of their cyclin D1-positive cases had centroblastic morphology with a non-GCB phenotype (CD10–/bcl-6+/MUM1+), as in our Taiwanese cases. In most of their cyclin D1-positive *de-novo* DLBCLs, the staining intensity was weak, in contrast to strong reactivity in the two cases with RT. The authors suggested that the higher cyclin D1 expression rate in their study was attributable to the higher sensitivity of the SP4 clone used; however, we and Metcalf *et al.*¹⁷ used the same clone and found a low cyclin D1 positivity rate, at 1–2%.

Our third cyclin D1-positive DLBCL was extremely unusual. It exhibited a focal starry-sky pattern and gene rearrangements involving *BCL6*, *MYC* and *IGH* loci, consistent with the provisional entity recently

defined as 'B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between DLBCL and BL' by the World Health Organization (WHO) classification.¹⁸ Morphologically, this tumour mimics BL and the blastoid variant of MCL. Immunophenotypically, it differs from BL by the absence of CD10 and expression of bcl-2. It is distinct from MCL in the expression of bcl-6 and the absence of CD5, CD43, or SOX11, the last of which is expressed in the majority of MCLs, as shown in our current study and in the literature.^{12–14} Furthermore, the absence of *CCND1* rearrangement argues against MCL. The starry-sky appearance of our case probably reflects the effects of the underlying *MYC* rearrangement. The t(8;14)(q24;q32) translocation juxtaposes *MYC* with *IGH*, resulting in deregulated expression of *MYC*, and driving cell proliferation and expression of other genes involved in cell growth and proliferation.^{19–21} Translocation involving *MYC* is frequently associated with a poor prognosis.^{20,22,23} Recently, DLBCLs exhibiting translocation involving 18q21/*BCL2* and 8q24/*MYC*, the so-called double-hit lymphomas, have been identified, and were associated with a very poor prognosis.^{24–27} Our case is distinct from these 'conventional' double-hit lymphomas by the presence of *IGH/MYC* translocation and *BCL6* rearrangement. Ueda *et al.*²⁸ reported a DLBCL with coexisting rearrangements of *MYC*, *BCL2*, and *BCL6*, a triple-hit lymphoma, and a favourable outcome, suggesting that multiple oncogene rearrangements may not necessarily be associated with poor clinical outcome, as in our third case.

The pathogenesis of cyclin D1-positive DLBCL has not been delineated. All cases studied so far have been negative for rearrangement at *CCND1* or reciprocal translocation involving *IGH/CCND1*.^{6,8,10,11,17} Only one case exhibited copy number gain of *CCND1*, and a few showed increased copy number or rearrangement of *MYC*.^{6,10,11} Incorporating the findings of our four cases, only two cases each so far in the literature have had rearranged *BCL6* and *IGH* loci, respectively, and all cases screened for *BCL2* rearrangement have been negative.⁶ The clinical course is variable, being aggressive in some patients, and with complete remission in others after R-CHOP therapy.^{8,10,11} Studies using more cases with detailed clinicopathological data are needed to define the outcome of patients with such rare tumours.

In summary, we have demonstrated a low prevalence of cyclin D1 expression in DLBCLs, and characterized the clinicopathological features of four cyclin D1-positive cases. All three cases from Taiwan were of the non-GCB phenotype, and were EBV-unrelated, i.e. excluding the WHO provisional entity of EBV-positive

DLBCL of the elderly. One unique case was a double-hit lymphoma, which has never been reported in association with cyclin D1 expression. The fourth case from Spain was distinct, with a GCB phenotype. All four cases studied were negative for *CCND1* rearrangement, excluding MCL. SOX11 immunostaining is useful in the differential diagnosis of cyclin D1-positive DLBCL from MCL, particularly the pleomorphic variant.

Acknowledgements

S.-C. Hsiao and I. R. Cortada contributed equally to this work, and they should be considered as joint first authors. This work was supported by research grants from Chi-Mei Medical Centre (CMFHR100047), Tainan and the National Science Council (100-2320-B-384-002), Taipei, Taiwan (to S.-S. Chuang) and from the Spanish Ministry of Science and Innovation 'Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología Española' (CICYT) SAF08/3630 (to E. Campo). Part of this work has been accepted for poster presentation at the 11th Korean–Japanese Lymphoreticular Workshop in Seoul in January 2012 and the 101th annual meeting of the United States and Canadian Academy of Pathology in Vancouver in March 2012.

Conflict of interest

The authors declare no conflicts of interest

References

1. Bosch F, Jares P, Campo E *et al.* PRAD-1/cyclin D1 gene overexpression in chronic lymphoproliferative disorders: a highly specific marker of mantle cell lymphoma. *Blood* 1994; **84**: 2726–2732.
2. de Boer CJ, Kluijn-Nelemans JC, Dreef E *et al.* Involvement of the *CCND1* gene in hairy cell leukemia. *Ann. Oncol.* 1996; **7**: 251–256.
3. O'Malley DP, Vance GH, Orazi A. Chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma with trisomy 12 and focal cyclin d1 expression: a potential diagnostic pitfall. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2005; **129**: 92–95.
4. Chang ST, Liao YL, Lu CL, Chuang SS, Li CY. Plasmablastic cytomorphologic features in plasma cell neoplasms in immunocompetent patients are significantly associated with EBV. *Am. J. Clin. Pathol.* 2007; **128**: 339–344.
5. Olsen B, Srkalovic G, Law M, McPhail E. Cyclin D1 positive follicular lymphoma. *J. Clin. Pathol.* 2009; **62**: 855–857.
6. Rodriguez-Justo M, Huang Y, Ye H *et al.* Cyclin D1-positive diffuse large B-cell lymphoma. *Histopathology* 2008; **52**: 900–903.
7. Ehinger M, Linderth J, Christensson B, Sander B, Cavallin-Stahl E. A subset of CD5- diffuse large B-cell lymphomas expresses nuclear cyclin D1 with aberrations at the *CCND1* locus. *Am. J. Clin. Pathol.* 2008; **129**: 630–638.
8. Teruya-Feldstein J, Gopalan A, Moskowitz CH. CD5 negative, cyclin D1-positive diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) presenting as ruptured spleen. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* 2009; **17**: 255–258.
9. Schneider A, Meyer P, DimMaio D, Fu K. Diffuse large B-cell lymphoma with both CD5 and cyclin D1 expression—a case report and review of the literature. *J. Hematop.* 2010; **3**: 145–148.
10. Vela-Chavez T, Adam P, Kremer M *et al.* Cyclin D1 positive diffuse large B-cell lymphoma is a post-germinal center-type lymphoma without alterations in the *CCND1* gene locus. *Leuk. Lymphoma* 2011; **52**: 458–466.
11. Lucioni M, Novara F, Riboni R *et al.* CD5(-) diffuse large B-cell lymphoma with peculiar cyclin D1+ phenotype. Pathologic and molecular characterization of a single case. *Hum. Pathol.* 2011; **42**: 1204–1208.
12. Ek S, Dictor M, Jerkeman M, Jirstrom K, Borrebaeck CA. Nuclear expression of the non B-cell lineage Sox11 transcription factor identifies mantle cell lymphoma. *Blood* 2008; **111**: 800–805.
13. Wang X, Asplund AC, Porwit A *et al.* The subcellular Sox11 distribution pattern identifies subsets of mantle cell lymphoma: correlation to overall survival. *Br. J. Haematol.* 2008; **143**: 248–252.
14. Mozos A, Royo C, Hartmann E *et al.* SOX11 expression is highly specific for mantle cell lymphoma and identifies the cyclin D1-negative subtype. *Haematologica* 2009; **94**: 1555–1562.
15. Chuang SS, Ye H, Yang SF *et al.* Perforation predicts poor prognosis in patients with primary intestinal diffuse large B-cell lymphoma. *Histopathology* 2008; **53**: 432–440.
16. Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC *et al.* Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood* 2004; **103**: 275–282.
17. Metcalf RA, Zhao S, Anderson MW *et al.* Characterization of D-cyclin proteins in hematolymphoid neoplasms: lack of specificity of cyclin-D2 and D3 expression in lymphoma subtypes. *Mod. Pathol.* 2010; **23**: 420–433.
18. Kluijn PM, Harris NL, Stein H *et al.* B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between DLBCL and Burkitt lymphoma. In Swerdlow SH, Campo E, Harris NL *et al.* eds. *WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues*. Lyon: IARC, 2008; 265–266.
19. Boxer LM, Dang CV. Translocations involving c-myc and c-myc function. *Oncogene* 2001; **20**: 5595–5610.
20. Kramer MH, Hermans J, Wijburg E *et al.* Clinical relevance of BCL2, BCL6, and MYC rearrangements in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 1998; **92**: 3152–3162.
21. Winter JN, Weller EA, Horning SJ *et al.* Prognostic significance of Bcl-6 protein expression in DLBCL treated with CHOP or R-CHOP: a prospective correlative study. *Blood* 2006; **107**: 4207–4213.
22. Vitolo U, Gaidano G, Botto B *et al.* Rearrangements of bcl-6, bcl-2, c-myc and 6q deletion in B-diffuse large-cell lymphoma: clinical relevance in 71 patients. *Ann. Oncol.* 1998; **9**: 55–61.
23. Akasaka T, Akasaka H, Ueda C *et al.* Molecular and clinical features of non-Burkitt's, diffuse large-cell lymphoma of B-cell type associated with the c-MYC/immunoglobulin heavy-chain fusion gene. *J. Clin. Oncol.* 2000; **18**: 510–518.
24. Kanungo A, Medeiros LJ, Abruzzo LV, Lin P. Lymphoid neoplasms associated with concurrent t(14;18) and 8q24/c-MYC translocation generally have a poor prognosis. *Mod. Pathol.* 2006; **19**: 25–33.
25. Le Gouill S, Talmant P, Touzeau C *et al.* The clinical presentation and prognosis of diffuse large B-cell lymphoma with

- t(14;18) and 8q24/c-MYC rearrangement. *Haematologica* 2007; **92**; 1335–1342.
26. Niitsu N, Okamoto M, Miura I, Hirano M. Clinical features and prognosis of de novo diffuse large B-cell lymphoma with t(14;18) and 8q24/c-MYC translocations. *Leukemia* 2009; **23**; 777–783.
27. Snuderl M, Kolman OK, Chen YB *et al.* B-cell lymphomas with concurrent IGH-BCL2 and MYC rearrangements are aggressive neoplasms with clinical and pathologic features distinct from Burkitt lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma. *Am. J. Surg. Pathol.* 2010; **34**; 327–340.
28. Ueda C, Nishikori M, Kitawaki T, Uchiyama T, Ohno H. Coexistent rearrangements of c-MYC, BCL2, and BCL6 genes in a diffuse large B-cell lymphoma. *Int. J. Hematol.* 2004; **79**; 52–54.

4.2 Manuscrito II

4.2.1 Manuscrito II: Datos

Título: Plasma cell and terminal B-cell differentiation in mantle cell lymphoma mainly occur in the SOX11-negative subtype

Autores: Inmaculada Ribera-Cortada, Daniel Martinez, Virginia Amador, Cristina Royo, Alba Navarro, Silvia Beà, Eva Gine, Laurence de Leval, Sergio Serrano, Andrew Wotherspoon, Dolors Colomer, Antonio Martinez, Elías Campo

Datos:

Revista: Modern Pathology (EEUU)

Factor de Impacto (2015): 6.187

Cuartil: 1er cuartil Patología

Referencia: Mod Pathol. 2015;28:1435-47.

PMID:26360498

4.2.2 Resumen:

El Linfoma de células del Manto es una neoplasia linfoide madura que se caracteriza por la presencia de t(11;14)(q13;q32) y la sobreexpresión de Ciclina D1. SOX11 es un factor de transcripción frecuentemente sobreexpresado en estos tumores pero ausente, en la mayoría de los otros linfomas maduros de células B y cuya función aún no se entiende bien. Estudios experimentales han demostrado que silenciamiento de SOX11 en células de Linfoma del Manto promueve el cambio fenotípico de células B maduras a un fenotipo de diferenciación plasmática inicial, sugiriendo que SOX11 puede contribuir al desarrollo tumoral al bloquear el programa de diferenciación de células B.

La relación entre la expresión de SOX11 y la diferenciación terminal de células B en Linfoma de células del Manto primario y su relación a la diferenciación plasmocítica observada en algunos casos es desconocida. En este estudio hemos investigado el fenotipo de diferenciación terminal de células B en 60 Linfomas de células del Manto, 41 SOX11-positivos y 19 SOX11-negativos.

Se observaron células plasmáticas monotípicas y células linfoides con diferenciación plasmocítica expresando Ciclina D1 en 7 (37%) casos SOX11-negativos pero en ninguno de los 41 casos SOX11-positivos ($p < 0.001$). Los tumores SOX11-negativos tenían más frecuentemente una expresión intensa citoplasmática con restricción de una cadena ligera de inmunoglobulina que los positivos (58% vs 13%) ($p = 0.001$). Similarmente los casos SOX11-negativos tenían una expresión de BLIMP1 y XBP1 significativamente más frecuente que en los casos positivos (83% vs 34% y 75% vs 11%, respectivamente) ($p = 0.001$). Sin embargo, no se observaron diferencias en la expresión de IRF4/MUM1 entre estos subtipos de Linfoma de células del Manto.

En conclusión, estos resultados indican que el Linfoma de células del Manto SOX11-negativo puede ser un subtipo particular de este tumor, que se caracteriza por presentar con mayor frecuencia características morfológicas e inmunofenotípicas de diferenciación terminal de células B, que pueden ser facilitadas por la ausencia del factor de transcripción SOX11.

Plasma cell and terminal B-cell differentiation in mantle cell lymphoma mainly occur in the SOX11-negative subtype

Inmaculada Ribera-Cortada^{1,2}, Daniel Martinez¹, Virginia Amador³, Cristina Royo³, Alba Navarro³, Silvia Beà³, Eva Gine^{3,4}, Laurence de Leval⁵, Sergio Serrano⁶, Andrew Wotherspoon⁷, Dolors Colomer^{1,3}, Antonio Martinez^{1,3} and Elías Campo^{1,3}

¹Hematopathology Unit, Department of Anatomic Pathology, Hospital Clinic, University of Barcelona, Barcelona, Spain; ²Hospital Nostra Senyora de Meritxell, Escaldes-Engordany, Principat d'Andorra; ³Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain; ⁴Department of Hematology, Hospital Clinic, University of Barcelona, Barcelona, Spain; ⁵Institute of Pathology, Centre Hospitalier Universitaire Vaudois, Lausanne, Switzerland; ⁶Department of Pathology, Hospital del Mar, Autonomous University of Barcelona, Barcelona, Spain and ⁷Department of Histopathology, Royal Marsden Hospital, London, UK

Mantle cell lymphoma is a mature lymphoid neoplasm characterized by the t(11;14)(q13;q32) and cyclin D1 overexpression. SOX11 is a transcription factor commonly overexpressed in these tumors but absent in most other mature B-cell lymphomas whose function is not well understood. Experimental studies have shown that silencing of SOX11 in mantle cell lymphoma cells promotes the shift from a mature B cell into an early plasmacytic differentiation phenotype, suggesting that SOX11 may contribute to tumor development by blocking the B-cell differentiation program. The relationship between SOX11 expression and terminal B-cell differentiation in primary mantle cell lymphoma and its relationship to the plasmacytic differentiation observed in occasional cases is not known. In this study we have investigated the terminal B-cell differentiation phenotype in 60 mantle cell lymphomas, 41 SOX11-positive and 19 SOX11-negative. Monotypic plasma cells and lymphoid cells with plasmacytic differentiation expressing cyclin D1 were observed in 7 (37%) SOX11-negative but in none of 41 SOX11-positive mantle cell lymphomas ($P < 0.001$). Intense cytoplasmic expression of a restricted immunoglobulin light chain was significantly more frequent in SOX11-negative than -positive tumors (58 vs 13%) ($P = 0.001$). Similarly, BLIMP1 and XBP1 expression was also significantly more frequent in SOX11-negative than in -positive cases (83 vs 34% and 75 vs 11%, respectively) ($P = 0.001$). However, no differences in the expression of IRF4/MUM1 were observed among these subtypes of mantle cell lymphoma. In conclusion, these results indicate that SOX11-negative mantle cell lymphoma may be a particular subtype of this tumor characterized by more frequent morphological and immunophenotypic terminal B-cell differentiation features that may be facilitated by the absence of SOX11 transcription factor.

Modern Pathology advance online publication, 11 September 2015; doi:10.1038/modpathol.2015.99

Mantle cell lymphoma is a mature B-cell neoplasm genetically characterized by the t(11;14)(q13;q32) leading to the overexpression of cyclin D1.¹ Other mechanisms involved in the progression of these tumors include alterations in components of the cell cycle regulation, DNA damage response, and apoptotic pathways.¹ SOX11 is a transcription factor

overexpressed in the vast majority of mantle cell lymphoma, including cyclin D1-negative cases, but it is absent in most other mature B-cell lymphomas, with the exception of some Burkitt lymphomas.^{2–6} The potential implication of SOX11 in the aggressive behavior of mantle cell lymphoma was initially suggested when it was recognized as one of the genes highly expressed in tumors requiring treatment at diagnosis compared with cases with a very indolent clinical course.⁷ The relationship between the absence of SOX11 expression and an indolent clinical behavior of these tumors has been confirmed in subsequent studies^{8–10} but not in others.¹¹

Correspondence: Dr E Campo, MD, PhD, Hematopathology Unit, Department of Anatomic Pathology, Hospital Clinic, University of Barcelona, Villarroel 170, 080136 Barcelona, Spain.

E-mail: ECAMPO@clinic.ub.es

Received 20 May 2015; accepted 15 July 2015; published online 11 September 2015

However, most aggressive SOX11-negative mantle cell lymphoma carry also *TP53* mutations and may, therefore, correspond to a transformed form of these tumors.^{10,11} The oncogenic potential of SOX11 has been confirmed experimentally by SOX11-knockdown studies that have shown a significant reduction of tumor growth *in vivo* of xenografted SOX11-negative mantle cell lymphoma cell lines.^{12,13}

The oncogenic mechanisms of SOX11 in mantle cell lymphoma pathogenesis are not well understood. We have recently shown that *PAX5* is one of the genes directly regulated by SOX11 in these tumor cells.¹³ *PAX5* is a critical transcription factor that determines and maintains the B-cell identity by activating B-cell-specific genes and simultaneously repressing genes that promote plasma cell differentiation.^{14–16} SOX11 knockdown in mantle cell lymphoma cell lines resulted in *PAX5* downregulation, increased expression of *BLIMP1* and *XBP1* and a switch in the gene expression signatures from a mature B-cell to an early plasmacytic differentiation profiling.¹³ These findings suggested that SOX11 could contribute to mantle cell lymphoma lymphomagenesis by blocking the terminal B-cell differentiation program of the cells as a similar mechanism observed in the inactivating mutations of *PRDM1/BLIMP1* in diffuse large B-cell lymphoma or the forced expression of *PAX5* by the t(9;14)(p13;q32) in some B-cell lymphomas.^{17–19} However, whether primary mantle cell lymphoma may modulate terminal B-cell differentiation features in relation to SOX11 expression is not well known.

The presence of plasmacytic differentiation is the defining feature of lymphoplasmacytic lymphomas²⁰ but a certain degree of this differentiation may also occur in other small B-cell lymphoid neoplasms such as chronic lymphocytic leukemia, follicular lymphoma, or marginal zone lymphoma.^{21–23} Recently, the L265P *MYD88* mutation has been recognized as very characteristic of Waldenström macroglobulinemia/lymphoplasmacytic lymphoma.²⁴ Although this mutation may also be present in other lymphoid tumors such as diffuse large B-cell lymphoma, chronic lymphocytic leukemia and occasional marginal zone lymphoma, it has not been observed in mantle cell lymphoma.^{25–28} The majority of mantle cell lymphoma have been classically described as a monotonous population of mature B cells without evidence of plasmacytic differentiation.²⁹ However, occasional mantle cell lymphomas with focal areas of plasma cell differentiation have been reported.^{30–32} These studies have emphasized the presence of mature clonally related plasma cells in otherwise classical mantle cell lymphoma but the potential relationship to SOX11 expression is not known. On the other hand, the expression of transcription factors regulating the switch from mature B-cell to plasma cells such *BLIMP1*, *IRF4/MUM1* and *XBP1* have not been well investigated in these tumors. Recognizing terminal B-cell differentiation in mantle cell lymphoma may be important in the differential diagnosis with other

B-cell neoplasms expressing this phenotype. In addition, the recent observation relating the resistance of mantle cell lymphoma to bortezomib, a drug with promising results in the treatment of these patients, to the development of an early plasmacytic differentiation³³ suggests that understanding this phenomenon may have also therapeutic relevance. The aims of this study were to determine the presence of terminal B-cell differentiation characteristics in mantle cell lymphoma and their possible relationship WITH SOX11 expression.

Materials and methods

Samples and Patients

We have included in the study 60 mantle cell lymphoma patients retrieved from the files of the Laboratory of Pathology of the Hospital Clinic of Barcelona based on the availability of formalin-fixed paraffin-embedded tissue for immunohistochemical studies. All cases overexpressed cyclin D1 by immunohistochemistry and in 18 cases the t(11;14)(q13;q32) had been confirmed by conventional cytogenetic or FISH studies. One case had been included in the previous study by Visco *et al*³² (Case 6). SOX11 nuclear protein was expressed in 41 cases, whereas 19 were SOX11-negative. SOX11 mRNA expression was also investigated by quantitative PCR in 23 mantle cell lymphoma cases, 15 SOX11-positive and 8 SOX11-negative and mRNA levels correlated to SOX11 protein expression as previously described.³⁴ The tissues investigated in the SOX11-positive cases were lymph nodes (29, 71%), spleen (5, 12%), spleen and lymph nodes (3, 7%), and other extranodal sites (4, 10%), whereas in the SOX11-negative cases were lymph nodes (3, 16%), spleen (10, 53%), spleen and lymph nodes (5, 26%), and other extranodal site (1, 5%).

Immunohistochemistry

Immunohistochemistry was performed on formalin-fixed paraffin-embedded material. The staining for cyclin D1, CD5, IRF4/MUM1, CD20, CD3, *BLIMP1*, *PAX5*, kappa, and lambda light chains were developed in an automated immunostainer (Autostainer-Link 48 DAKO). Antigen retrieval was done for 20 min in Envision Flex TRS High pH (pH 9, DAKO) or Low pH (pH6, DAKO) buffer solution at 98 °C accordingly. The primary antibodies, monoclonal rabbit anti-human cyclin D1 clone SP4 (Ready to Use DAKO), monoclonal rabbit anti-human CD5 clone SP19 (Ready to Use, DAKO), monoclonal mouse anti-human MUM1-protein clone MUM1p (Ready to Use, DAKO), monoclonal mouse anti-human CD20 clone L26 (Ready to Use DAKO), monoclonal mouse anti-human CD3 clone CD3-PS1 (diluted 1:60 Novocastra), monoclonal mouse anti-human *BLIMP1* antibody provided by Dr G Roncador (Centro Nacional Investigaciones Oncológicas diluted 1:3),

Table 1 Clinical and pathological characteristics of the 60 mantle cell lymphomas

<i>Patients</i>	<i>SOX11-negative mantle cell lymphoma</i> n = 19	<i>SOX11-positive mantle cell lymphoma</i> n = 41	<i>P-value</i>
No.	19	41	
Median age, years (range)	72 (53–80)	64 (42–89)	
Male	10/19 (53%)	38/41 (93%)	0.001
CD5 expression	12/18 (67%)	35/36 (97%)	0.002
<i>Histology</i>			
Small cell	11/19 (58%)	1/41 (2%)	< 0.001
Classic	7/19 (37%)	33/41 (81%)	0.002
Blastoid/pleomorphic	1/19 (5%)	7/41 (17%)	0.211
Ki67 index mean ± s.d.	20 ± s.d.18	34.5 ± s.d.23	0.017
<i>Ann Arbor stage</i>			
I/III	0/11 (0%)	3/28 (11%)	
IV	11/11 (100%)	25/28 (89%)	0.258
LDH level > normal	2/9 (22%)	10/22 (45%)	0.452
Mutated <i>IGHV</i> (< 98% identity)	7/11 (64%)	1/25 (4%)	< 0.001
Non-nodal presentation	15/19 (79%)	8/41 (20%)	< 0.001
Leukemic involvement	11/12 (92%)	21/28 (75%)	0.227
Bone marrow involvement	11/11 (100%)	25/28 (89%)	0.258
<i>Pathology</i>			
Plasma cell differentiation	7/19 (37%)	0/41 (0%)	< 0.001
Cytoplasmic light-chain expression	11/19 (58%)	5/39 (13%)	0.001
BLIMP1 expression	15/18 (83%)	13/38 (34%)	0.001
MUM1 expression	10/19 (53%)	18/40 (45%)	0.705
XBP1 expression	12/16 (75%)	4/38 (11%)	< 0.001
<i>Therapy</i>			
No chemotherapy	9/14 (64%)	1/28 (4%)	< 0.001
Chemotherapy	5/14 (36%)	27/28 (96%)	< 0.001
Median survival, range (months)	103 (64–141)	44 (24–64)	0.024

monoclonal mouse anti-human B Cell Specific Activator Protein Clone DAK-PAX5 (Ready to Use DAKO), polyclonal rabbit anti-human kappa light chain, and polyclonal rabbit anti-human lambda light chain (DAKO both diluted 1:128 000) were incubated followed by the secondary antibody Envision Flex Rabbit and Mouse linker, respectively. A peroxidase-based EnVision Flex/HRP system (DAKO) was used for the detection and 3,3'-diaminobenzidine as a chromogen. For SOX11 and XBP1, the slides were processed in a fully automated immunostainer (Bond Max, Vision Biosystems, Mount Waverley, Australia). The procedure was the same as described above. Antigen retrieval was done for 20 min in Bond ER Buffer solution (pH 9 and pH 6, Vision Biosystems, respectively). The primary antibodies were mouse monoclonal anti-SOX11¹⁴³ (AMAb90502, clone CL0143; Atlas Antibodies, Stockholm, Sweden at 1:100), rabbit polyclonal anti-SOX11^{HPA000536} (HPA 000536, Atlas Antibodies, Stockholm, Sweden at 1:400 dilution) and mouse monoclonal anti-XBP1 (Santa Cruz diluted 1:400). Bond Refine Polymer (Vision Biosystems) was used as secondary antibody for detection.

Slides were reviewed, analyzed, and photographed on a Olympus BX51 microscope, by means of DP70 cooled CCD camera (Olympus) with the use of Cell^B imaging software (Olympus). The antigen expression was considered positive if ≥ 10% of tumor cells showed strong positive staining. This quantitative index was obtained by counting the number of positive tumor cells within 200 tumor cells in a High Power Field (×40) within a representative tumor area. The statistical analyses were performed using the SPSS software package version 21 (SPSS, Chicago, IL, USA).

DNA Extraction and Assessment of *MYD88* Mutation

DNA was isolated with the QIAamp DNA mini kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions from formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections. *MYD88* mutations were studied in 16 mantle cell lymphoma cases, using an allele-specific PCR for the L265P mutation in 11 (7 SOX11-negative and 4 SOX11-positive cases) and sequencing exon 5 in 12 (6 SOX11-negative and 6 SOX11-positive cases). Seven cases were investigated with both approaches

obtaining similar results. The protocol for analysis using an allele-specific PCR was previously described.³⁵ *MYD88* exon 5 was amplified with the primers forward: 5'-TGCCAGGGTACTTAGATGG-3' and reverse 5'-GAAGTTGGCATCTCCAGGAA-3'. Sequences were analyzed with the Mutation Surveyor (Softgenetics).

Results

Clinical Characteristics

The main clinical and pathological characteristics of the patients are summarized in Table 1. The 19 SOX11-negative mantle cell lymphomas presented with a non-nodal disease more frequently than positive tumors (79 vs 20% $P < 0.001$). Leukemic expression was observed in 11/12 (92%) SOX11-negative and in 21/28 (75%) positive cases. Bone marrow involvement was present in 100 vs 89% in SOX11-negative and -positive tumors, respectively (Table 1). No bone lytic lesions or hypercalcemia was reported in any of the cases. SOX11-negative cases had a more indolent clinical course, as fewer patients with this subtype of mantle cell lymphoma needed chemotherapy at diagnosis (36 vs 96% $P < 0.001$) and the overall median survival was longer than in patients with SOX11-positive mantle cell lymphoma (103 months, range 64–141 vs 44 months, range 24–64, $P = 0.024$) (Figure 1).

Histopathology

All cases were diagnosed as mantle cell lymphoma based on their morphological and immunophenotypic features and were cyclin D1 and PAX5 positive (Table 1). SOX11-negative mantle cell lymphoma had small cell morphology in 58% of the cases,

classical in 37%, and blastoid in only one case (5%) (Table 1). The cytological variants of SOX11-positive cases were classical in 81%, small cell in 2%, and blastoid in 17%. The three SOX11-negative cases with nodal biopsies had preserved reactive germinal centers, whereas this feature was only observed in 8/29 SOX11-positive tumors with nodal presentation (100 vs 28% $P = 0.012$). Finally, the Ki67 proliferation index was significantly lower in the SOX11-negative than -positive cases ($20 \pm s.d. 18$ vs $34.5 \pm s.d. 23$, $P = 0.017$) (Table 1).

Monotypic Plasma Cells in SOX11-Negative Mantle Cell Lymphoma

Polytypic plasma cells were commonly seen in virtually all cases independently of SOX11 expression. However, a monotypic plasma cell population and variable number of lymphoid cells with plasmacytic differentiation were focally seen in 7 of the 19 (37%) SOX11-negative but in none of the SOX11-positive cases ($P < 0.001$). All these cases had an atypical lymphoid component that could be diagnosed as mantle cell lymphoma, classical in three cases, and small cell variant in four (Figure 2). The monotypic plasma cells were seen in three splenic, three nodal, and one periorbital tumors. Dutcher bodies were found in three of these cases. The monotypic plasma cells in the spleen formed small clusters and sheets with a peritrabecular and periarteriolar distribution (Figure 3). In the nodal and periorbital cases the plasma and lymphoplasmacytic cells were more intermingled with the atypical lymphoid cells. Interestingly, in nodal cases with persistent reactive germinal centers, monotypic plasma cells and cells with Dutcher bodies could be seen within the mantle zones (Figure 4).

All cells with plasmacytic differentiation, including the ones with Dutcher bodies, were cyclin D1 positive, supporting that they belonged to the same neoplastic population as the atypical lymphoid cells (Figure 4). The presence of the $t(11;14)(q13;q32)$ was confirmed in the four of these seven cases in which it was examined. Five (71%) cases expressed kappa and two expressed (29%) lambda. IgM and IgD expression by immunohistochemistry was observed in three of four cases and three of five, respectively, whereas CD5 expression was observed in four of seven cases. Interesting, although the neoplastic populations of atypical lymphoid cells were PAX5 positive, the monotypic plasma cells were PAX5 negative (Figure 3). An elevated monoclonal IgM component in the serum was detected in three patients. Three of these seven cases in which the *IGHV* mutational status could be studied showed $> 2\%$ mutations. These seven cases had an indolent clinical evolution as none of them required chemotherapy for at least 2 years after diagnosis.

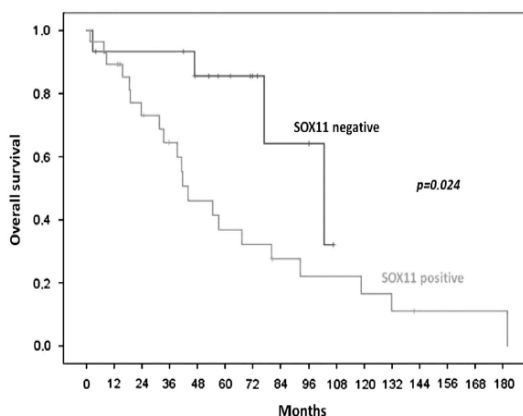


Figure 1 Overall survival in mantle cell lymphoma patients according to SOX11 expression. Overall median survival was longer in patients with SOX11-negative ($n = 16$) than SOX11-positive ($n = 28$) mantle cell lymphoma (103 months 95% confidence interval 64–141 vs 44 months 95% confidence interval 24–64) ($P = 0.024$).

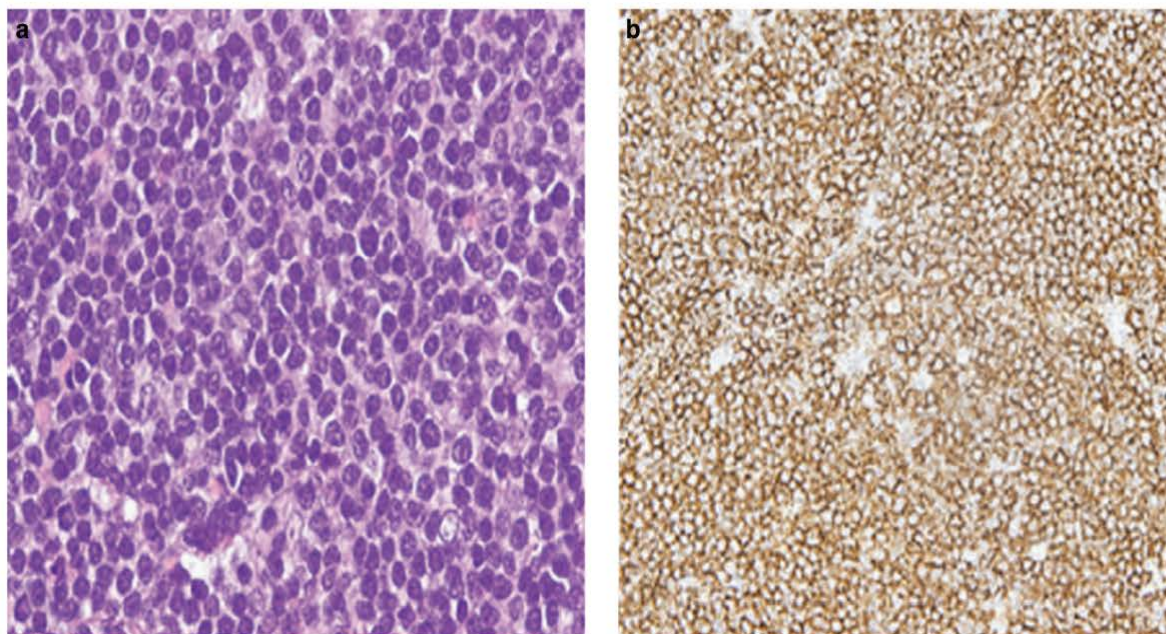


Figure 2 SOX11-negative mantle cell lymphoma with monotypic plasma cell showed a main component with small cell morphology. (a) H&E, (b) CD20, (c) CD3, (d) CD5, (e) cyclin D1, (f) BLIMP1. H&E, hematoxylin and eosin.

Immunohistochemical Findings

An intense cytoplasmic light-chain protein expression was seen in 11 of the 19 (58%) SOX11-negative mantle cell lymphomas, including the 7 with monotypic plasma cells, but only in 5 of 39 (13%) SOX11-positive tumors ($P=0.001$) (Figure 5). Flow cytometry studies performed in cell suspensions of three of the seven SOX11-negative cases with plasmacytic cell differentiation confirmed the same surface kappa light chain restriction in lymphoid cells as the cytoplasmic light chain observed in the plasma cells by immunohistochemistry.

IRF4/MUM1 expression in $>10\%$ of tumor cells was detected in 10/19 (53%) SOX11-negative and in 18/40 (45%) SOX11-positive tumors. No differences in the total number of positive cells in both subtypes of mantle cell lymphoma were seen (Figure 5). In addition to plasma and lymphoplasmacytic cells of the 7 SOX11-negative cases, atypical lymphoid cells were also frequently positive in both SOX11-negative and -positive tumors. IRF4/MUM1-positive cells tended to form clusters and large nodular aggregates in both subtypes of SOX11-negative and -positive tumors (Figure 5).

The expression of the plasmacytic transcription factor BLIMP1 was more frequently seen in SOX11-negative than in -positive tumors (83 vs 34% $P=0.001$) (Figure 2f and 5) (Table 1). The number of positive cells was variable among cases but was also higher in SOX11-negative (mean $26\% \pm$ s.d. 23) than in -positive tumors (mean $13\% \pm$ s.d. 19) ($P < 0.04$) (Figure 6a). BLIMP1 was not only expressed in plasma and lymphoplasmacytic cells but also in atypical lymphoid cells without morphological

plasmacytic differentiation. Cases with high number of positive cells tend to have a diffuse distribution, whereas in cases with smaller number of cells they tended to concentrate in nodules.

Finally, to complete the assessment of plasmacytic differentiation we examined the expression of the transcription factor XBP1 (Figure 5). Similarly to BLIMP1, XBP1 nuclear expression was significantly more frequent in SOX11-negative than -positive mantle cell lymphomas (75 vs 11% $P < 0.001$) (Table 1). The mean value of the number of positive XBP1 tumor cells in SOX11-negative cases was also higher than in SOX11-positive tumors ($12\% \pm$ s.d. 10 vs $3\% \pm$ s.d. 4) ($P < 0.004$) (Figure 6b). The number of XBP1-positive cells was almost always lower than the BLIMP1 expressing cells but were found with a similar topographic distribution. Interestingly, whereas 11 of the 12 (92%) cases considered positive for XBP1 also expressed BLIMP1 in the SOX11-negative cases, only 1 of the 4 (25%) SOX11-positive case expressed both proteins.

MYD88 Mutations

MYD88 mutations were studied in nine SOX11-negative mantle cell lymphoma, including the seven cases with plasmacytic differentiation and in seven SOX11-positive cases. The *MYD88* L256P mutation was only found in one SOX11-negative mantle cell lymphoma with plasmacytic differentiation (Figure 4). This case had areas of small atypical lymphoid cells consistent with mantle cell lymphoma, and cyclin D1 could be clearly demonstrated in

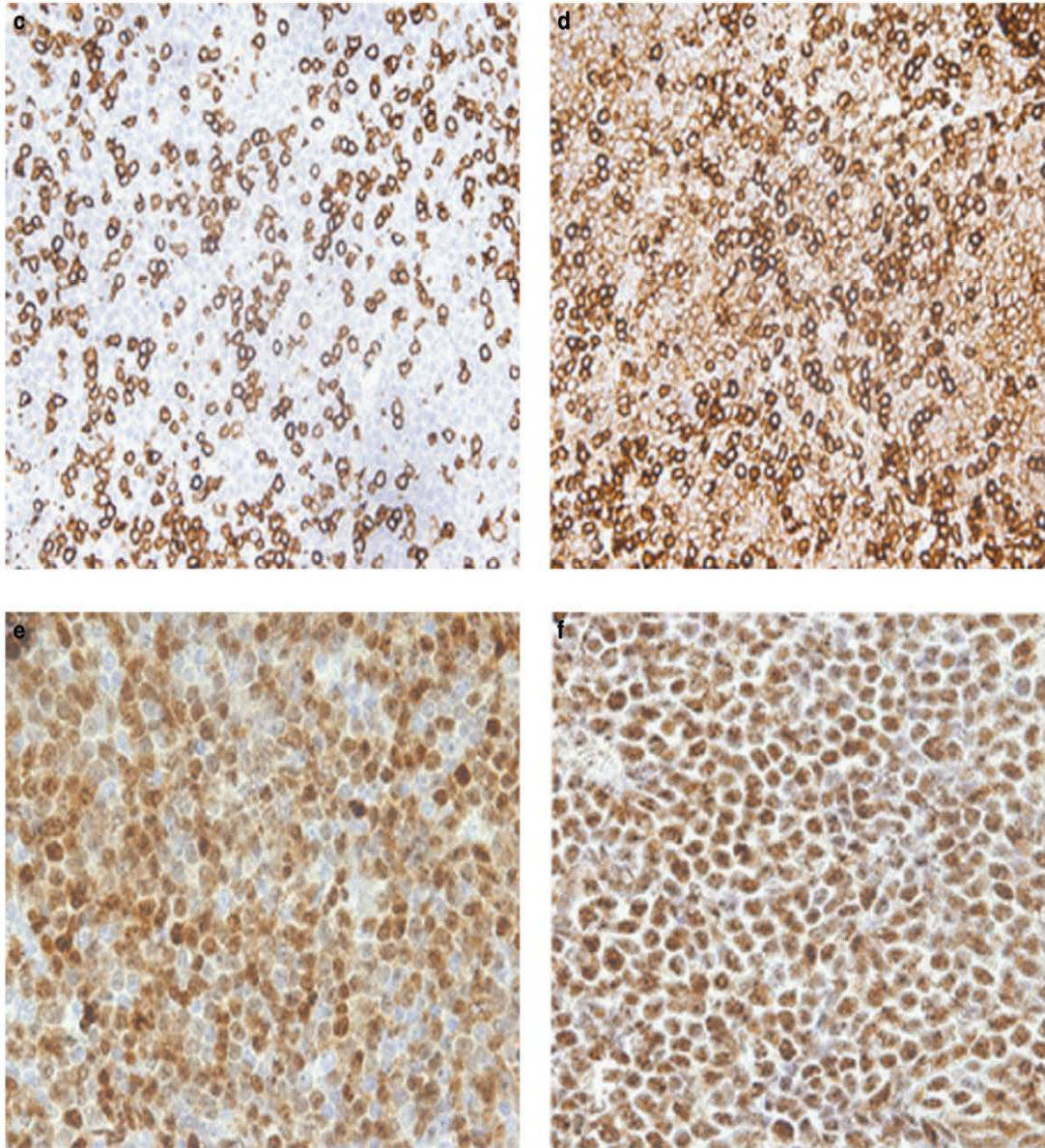


Figure 2 Continued.

plasma cells and cells with Dutcher bodies. The $t(11;14)(q13;q32)$ was demonstrated by FISH.

Discussion

Plasmacytic differentiation is a phenomenon seen in different types of small B-cell lymphomas with variable frequency.^{21,23} It constitutes an essential element in the definition of lymphoplasmacytic lymphoma and may be seen with different degree in marginal zone lymphoma, follicular lymphoma, and chronic lymphocytic leukemia. Classical mantle cell lymphoma has been considered as a tumor composed of a monotonous proliferation of small to

medium-sized lymphoid cells with irregular nuclei. Different morphological variants have been recognized such as blastoid and small cell. The small cell variant seen in 58% of our SOX11-negative tumors is composed of small lymphocytes with rounded nuclei, dense chromatin, and scanty cytoplasm mimicking small lymphocytic lymphoma. However, prolymphocytes, paraimmunoblasts or proliferation centers are never found in this variant.³⁶

Contrary to other small B-cell lymphomas, plasmacytic differentiation is not usually found in mantle cell lymphoma. However, in recent years, several studies have reported occasional tumors with clonally related monotypic plasma cells.^{30-32,37} These cases are rare but have raised questions on the potential mechanisms

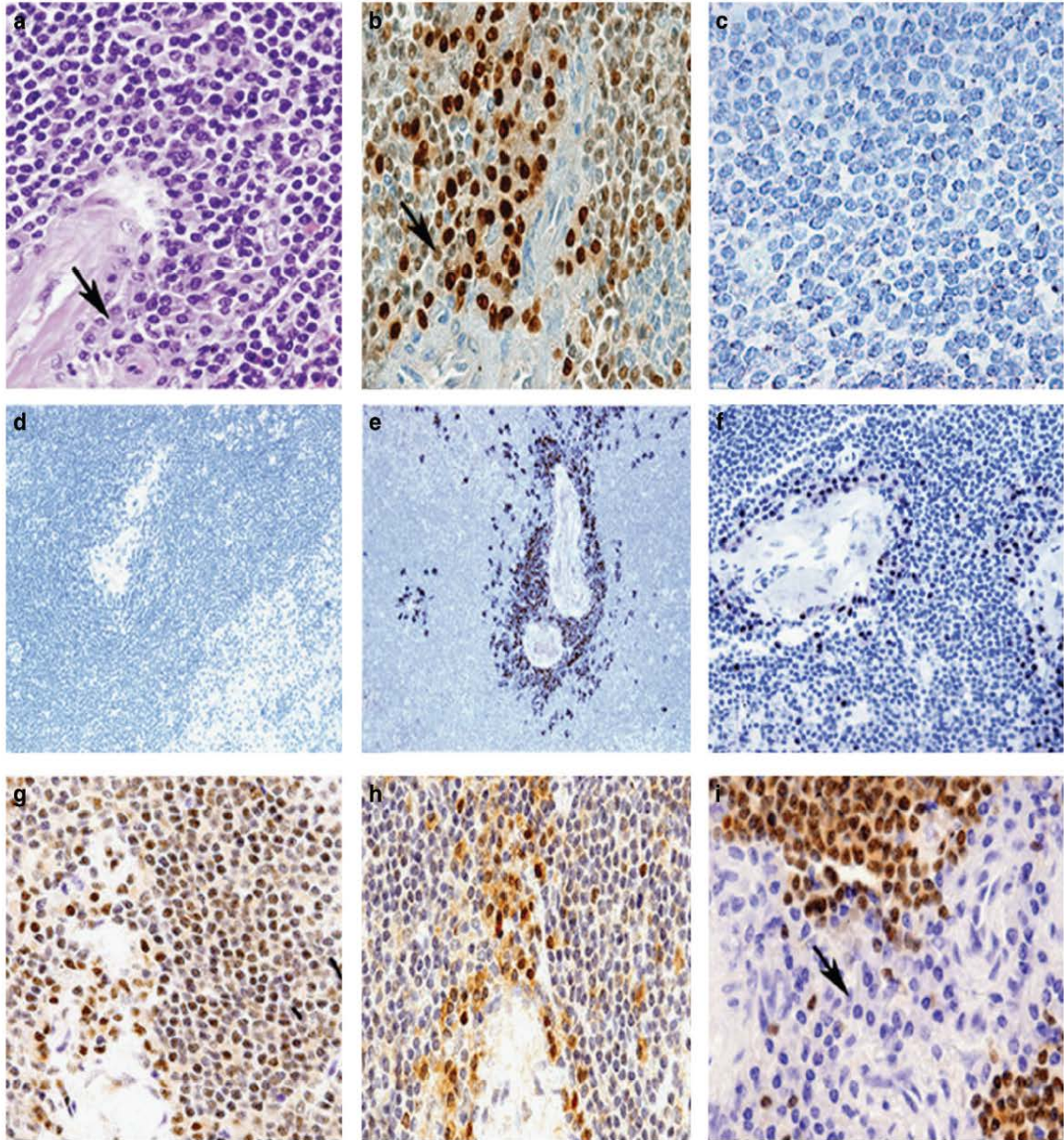


Figure 3 Plasma cell differentiation in mantle cell lymphoma: splenic SOX11-negative mantle cell lymphoma with a Lambda monotypic plasma cell population. (a) H&E with black arrow indicating a periarteriolar plasma cell distribution, (b) cyclin D1 with black arrow indicating cyclin D1-positive plasma cells with periarteriolar distribution, (c) SOX11, (d) kappa, (e) lambda with a distinctive monotypic peritrabecular plasma cell distribution, (f) IRF4/MUM1, (g) BLIMP1, (h) XBP1, (i) PAX5 with black arrow indicating PAX5-negative periarteriolar plasma cell distribution. H&E, hematoxylin and eosin.

involved in their terminal B-cell. This process is normally regulated by the coordinated action of several transcription factors including PAX5, IRF4/MUM1, BLIMP1, and XBP1.^{14–17} PAX5 maintains the mature B-cell differentiation program and represses the expression of BLIMP1 required to turn on the plasma cell differentiation program by activating XBP1 among other factors. IRF4/MUM1 is initially expressed in a small number of germinal center cells committed to exit this microenvironment and progress toward plasma cells. The expression of these

transcription factors in mantle cell lymphoma and their possible relationship to the plasma cell differentiation has not been investigated. In a recent experimental study we demonstrated that SOX11, a transcription factor expressed in ~90% of mantle cell lymphomas, binds directly to the promoter region of PAX5 and regulates positively its expression that in turn represses BLIMP1 and blocks the terminal differentiation of mantle cell lymphoma cells.¹³ These observations made us hypothesize that plasma cell differentiation and upregulation of transcription

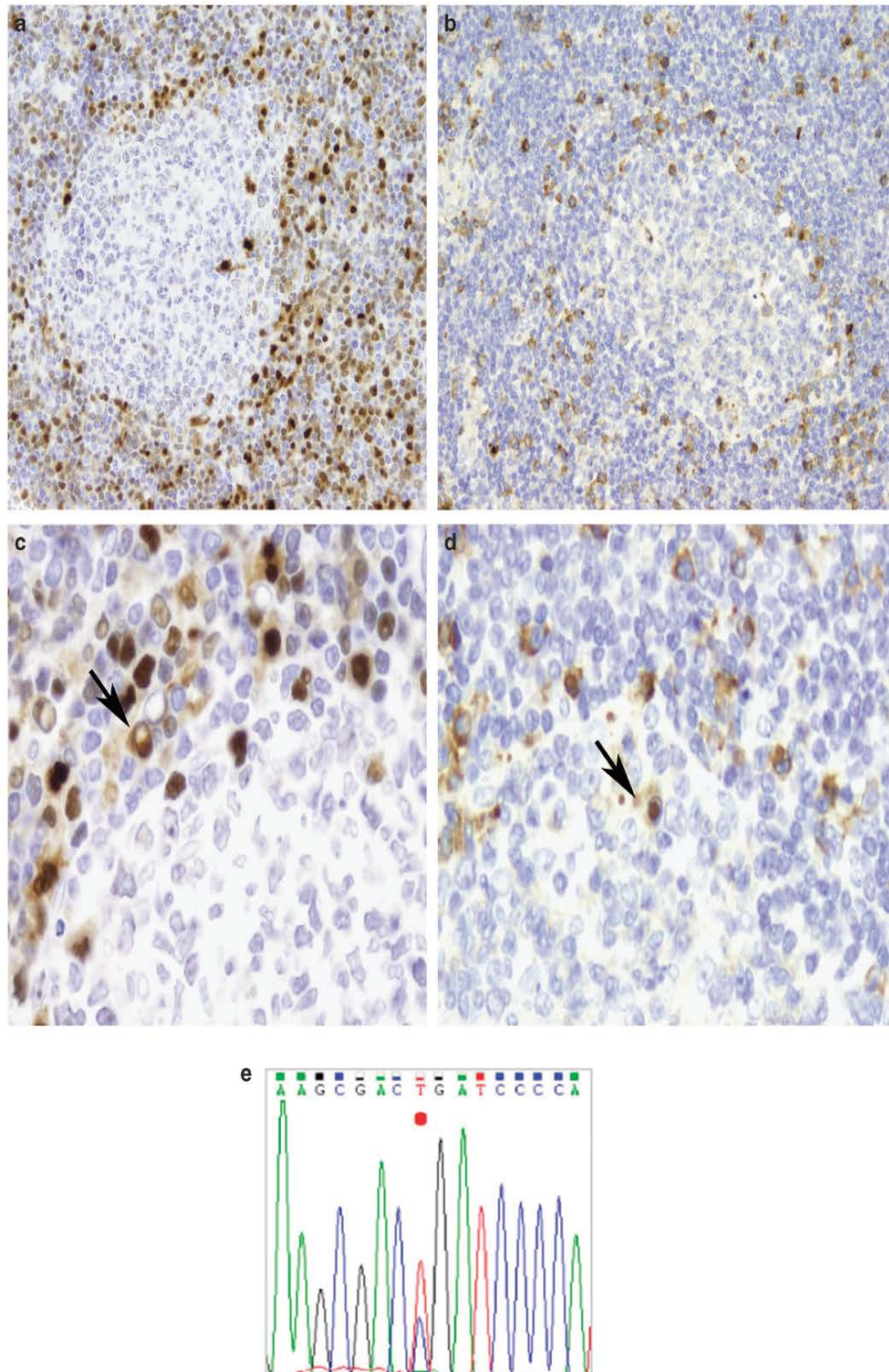


Figure 4 Lymphoplasmacytic cells with Dutcher bodies in cyclin D1-positive SOX11-negative mantle cell lymphoma. (a) Cyclin D1-positive lymphoplasmacytic cells with mantle zone distribution, (b) kappa monotypic plasma cells with mantle zone distribution, (c) cyclin D1-positive cells with Dutcher bodies indicated by black arrow, (d) kappa monotypic Dutcher bodies indicated by black arrow, (e) Sanger sequencing of *MYD88* mutation in SOX11-negative mantle cell lymphoma with plasmacytic differentiation.

factors related to the terminal B-cell differentiation program in mantle cell lymphoma could be a phenomenon mainly occurring in SOX11-negative tumors.

In the current study, we have identified the presence of monotypic plasma cells and lymphoid cells with plasmacytic features in 7 of 60 mantle cell

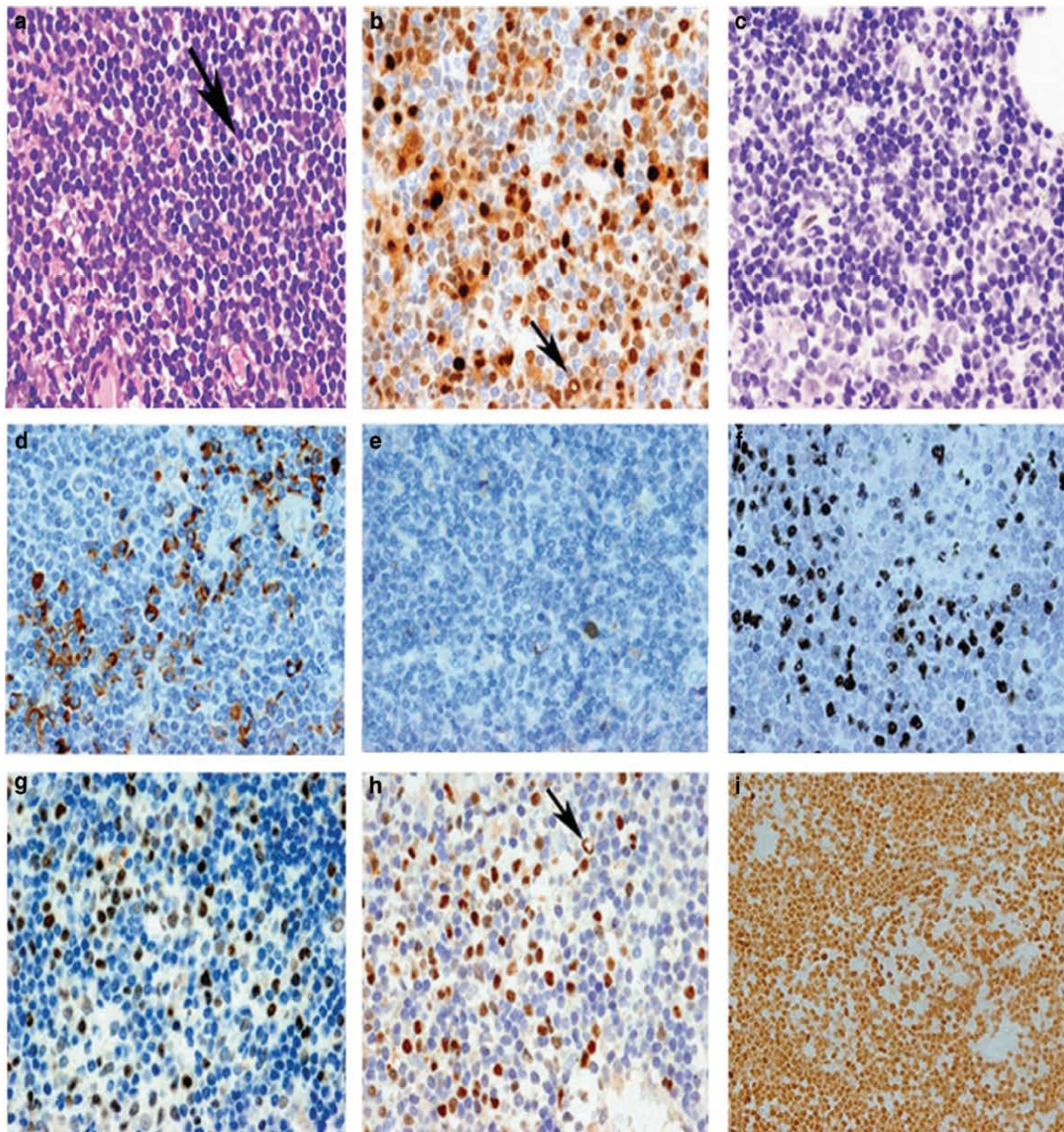


Figure 5 Cytoplasmic light chain expression, IRF4/MUM1, BLIMP1, and XBP1 expression in a SOX11-negative case. (a) H&E with black arrow indicating Dutcher body, (b) cyclin D1 with black arrow indicating Dutcher body, (c) SOX11, (d) kappa, (e) lambda, (f) IRF4/MUM1, (g) BLIMP1, (h) XBP1 with black arrow indicating Dutcher body, (i) PAX5. H&E, hematoxylin and eosin.

lymphomas. This incidence should not be considered representative, as some of these cases had been sent in consultation because of this unusual feature. CD5 positivity was observed in 57% and IgD expression in 60% of these cases. In all cases, the plasma and lymphoplasmacytic cells with Dutcher bodies had strong nuclear expression of cyclin D1 and in three cases in which flow cytometry was performed the atypical lymphoid cells expressed the same light-chain restriction than the plasma cells. These findings suggest that the monoclonic plasma cells and mantle cell lymphoma cells belong to the same tumor. In one of these cases, the clonal relationship between

plasma cells and mantle cell lymphoma cells had been previously demonstrated by molecularly investigating the *IGH* rearrangement.³² Interestingly, the seven cases with the plasma cell component were SOX11-negative, confirming the idea that the absence of this transcription factor may allow mantle cell lymphoma cells to progress in the terminal B-cell differentiation process.

The clinical and pathological presentations of these seven cases had similarities with the eight previous reported mantle cell lymphomas with clonal plasma cells.^{30–32,37} Most of these patients had nodal involvement but extranodal dissemination

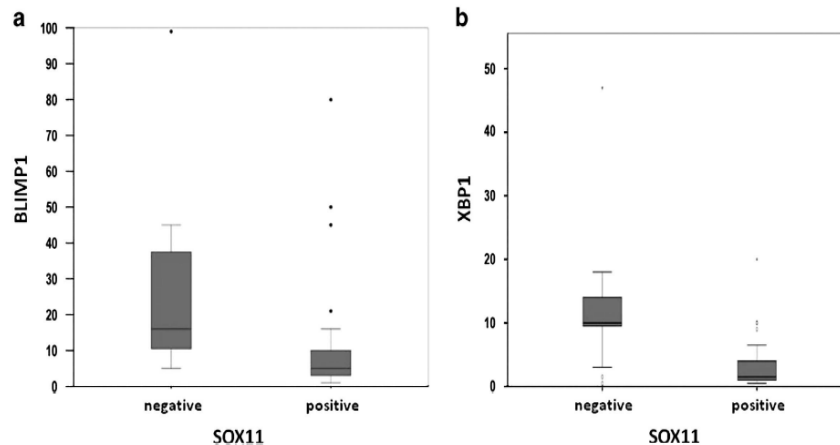


Figure 6 (a) Percentage of BLIMP1-positive cells in SOX11-negative and positive mantle cell lymphoma; (b) percentage of XBP1-positive cells in SOX11-negative and -positive mantle cell lymphoma.

was also frequent. One previous case had a periorbital presentation as one of our patients.³² Three cases had a mantle zone growth pattern and most cases had been cytologically considered classical mantle cell lymphoma except one pleomorphic variant. One previous case had an intriguing clonally related plasmablastic differentiation in the transformation of a classical mantle cell lymphoma.³⁷ Interestingly, the three cases in which we could investigate the *IGHV* mutational status had a low level of identity with the germline (< 2%), indicating that these tumors derive from cells that have experienced the germinal center microenvironment, a feature also common in SOX11-negative mantle cell lymphoma.³⁸ The clinical course of these seven cases was indolent, as none of the patients required chemotherapy for at least 2 years, a behavior similar to that described in other SOX11-negative mantle cell lymphomas.^{7–10}

To expand the analysis of the terminal B-cell differentiation program in mantle cell lymphoma, we investigated the expression of cytoplasmic immunoglobulin light chains, IRF4/MUM1, BLIMP1, and XBP1. A restricted and intense cytoplasmic light chain was seen more commonly in SOX11-negative (58%) than in -positive (13%) cases. IRF4/MUM1 expression has been observed in 10–50% of mantle cell lymphoma without a clear relationship to particular clinical or pathological features of the tumors.^{39–42} The IRF4/MUM1 positivity in 47% of our cases is similar to these reports. In addition, we did not observe differences in the expression between SOX11-negative (53%) and -positive (45%) tumors. This finding in primary tumor samples is concordant with our previous experimental observation of the lack of modulation of IRF4/MUM1 by SOX11 silencing in mantle cell lymphoma cell lines, suggesting an independent regulation of these transcription factors in these tumors.¹³

BLIMP1 and XBP1 are expressed in plasma cell neoplasias and aggressive lymphomas with plasmablastic differentiation but their distribution in small

B-cell lymphomas has been less investigated.⁴³ We found a relatively high expression of these transcription factors in mantle cell lymphoma and both of them were significantly more common in SOX11-negative than in -positive tumors. The knockdown of SOX11 by shRNA in mantle cell lymphoma cell lines leads to a downregulation of PAX5 and a switch toward the terminal B-cell differentiation program with increased expression of BLIMP1 and XBP1.¹³ Our BLIMP1 and XBP1 findings in primary SOX11-negative tumors are consistent with the observation in the experimental model. However, we did not see a clear downregulation of PAX5 in SOX11-negative tumors, although the monotypic plasma cells were PAX5 negative. PAX5 is expressed in all mature B-cell lymphomas and its regulation includes complex mechanisms. Our findings would be consistent with the idea that SOX11 expression may prevent the downregulation of PAX5 and the absence of this transcription factor may allow tumor cells to be more responsive to regulatory stimuli promoting terminal B-cell differentiation.

The differential diagnosis of small B-cell lymphomas with plasmacytic differentiation encompasses several entities. The general agreement is that these tumors must be classified according to the atypical lymphoid component. The identification of cyclin D1 expression or the t(11;14)(q13;q32) may facilitate the diagnosis of mantle cell lymphoma. However, given that plasmacytic differentiation in these tumors is rare, and some of these may be CD5-negative, the recognition of a small B-cell lymphoma with terminal B-cell differentiation as mantle cell lymphoma may be challenging. The presence of Dutcher bodies and a monoclonal component in the serum may suggest the diagnosis of lymphoplasmacytic lymphoma or less frequently marginal zone lymphoma. However, the clinical presentation with generalized lymphadenopathy and leukemic expression in some cases should raise the possibility of a mantle cell lymphoma. The recent identification of *MYD88* mutations as a genetic hallmark of lymphoplasmacytic lymphoma may help

in establishing this diagnosis, and its absence would favor a different small B-cell lymphoma.^{24,27} The same mutation has been reported in occasional cases of marginal zone lymphoma. However, although some genuine marginal zone lymphoma may carry the mutation, a positive result must be interpreted with caution.²⁷ *MYD88* mutations have been also identified in 3% of chronic lymphocytic leukemia and they seem to recognize a particular subgroup of young patients with good prognosis and without plasmacytic differentiation.²⁸ The finding of the L256P *MYD88* mutation in one of our mantle cell lymphoma with plasmacytic differentiation is surprising, as these mutations have been investigated in >100 mantle cell lymphomas and all had been negative and it was also negative in the remaining six cases with monocytic plasma cells in this study.^{44–48} In our *MYD88*-mutated case cyclin D1 was unequivocally positive in plasma cells and cells with Dutcher bodies, and the tumor carried the t(11;14)(q13;q32) supporting the diagnosis of mantle cell lymphoma and excluding the existence of two different tumors. The consideration of this case as a real mantle cell lymphoma, or alternatively as a lymphoplasmacytic lymphoma or marginal zone lymphoma with the t(11;14)(q13;q32) may be debatable. However, *MYD88* mutations seem to be less specific than the t(11;14)(q13;q32) defining an entity and the tumor cells with plasmacytic differentiation had a distribution in the mantle zone of residual follicles highly suggestive of a mantle cell lymphoma pattern.

The differential diagnosis with plasma cell myeloma t(11;14)(q13;q32) positive should be also considered.^{49,50} Recently, several studies have investigated SOX11 immunohistochemical expression in 56 cases of plasmacytoma/myeloma (73% cyclin D1-positive and 27% cyclin D1-negative) including 12 cyclin D1-positive cases, which presented also the t(11;14)(q13;q32). No nuclear SOX11 expression was found in any of these cases.^{3,6,34,51,52} However, mantle cell lymphoma with plasmacytic differentiation in this and previous studies are CD5 positive in 57%, and tend to present with generalized lymphadenopathy and leukemic involvement without lytic bone lesions, all of them unusual features in plasma cell myeloma.

In conclusion, our study supports the idea that SOX11-negative mantle cell lymphoma is a particular subtype of these tumors characterized by more frequent morphological and phenotypic terminal B-cell differentiation features that may be facilitated by the absence of this transcription factor. The recognition of these features expands the spectrum of small B-cell lymphomas with plasmacytic differentiation in which this subset of mantle cell lymphoma should be included.

Acknowledgments

This work was supported by the grant from MINECO Plan Nacional SAF12/38432 (EC), Generalitat de

Catalunya AGAUR 2014-SGR-795 (EC), AGAUR 2014SGR967 (to DC) and Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer (RD12/0036/0036) (EC) and (RD12/0036/0004) (DC). EC is a researcher of the Academia 'Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats' (ICREA). DM was supported by Instituto de Salud Carlos III, 'Contratos de Formación en Investigación Río-Hortega' CM12/00054. AM is supported by Instituto de Salud Carlos III, European Regional Development Fund (ERDF) 'One way to Europe' (FIS PI11/00907, PI14/00333).

Disclosure/conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Jares P, Colomer D, Campo E. Molecular pathogenesis of mantle cell lymphoma. *J Clin Invest* 2012;122:3416–3423.
- Ek S, Dictor M, Jerkeman M *et al*. Nuclear expression of the non B-cell lineage Sox11 transcription factor identifies mantle cell lymphoma. *Blood* 2008;111:800–805.
- Dictor M, Ek S, Sundberg M *et al*. Strong lymphoid nuclear expression of SOX11 transcription factor defines lymphoblastic neoplasms, mantle cell lymphoma and Burkitt's lymphoma. *Haematologica* 2009;94:1563–1568.
- Salaverria I, Royo C, Carvajal-Cuenca A *et al*. CCND2 rearrangements are the most frequent genetic events in cyclin D1(-) mantle cell lymphoma. *Blood* 2013;121:1394–1402.
- Xu W, Li JY. SOX11 expression in mantle cell lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2010;51:1962–1967.
- Mozos A, Royo C, Hartmann E *et al*. SOX11 expression is highly specific for mantle cell lymphoma and identifies the cyclin D1-negative subtype. *Haematologica* 2009;94:1555–1562.
- Fernandez V, Salamero O, Espinet B *et al*. Genomic and gene expression profiling defines indolent forms of mantle cell lymphoma. *Cancer Res* 2010;70:1408–1418.
- Ondrejka SL, Lai R, Smith SD *et al*. Indolent mantle cell leukemia: a clinicopathological variant characterized by isolated lymphocytosis, interstitial bone marrow involvement, kappa light chain restriction, and good prognosis. *Haematologica* 2011;96:1121–1127.
- Espinete B, Ferrer A, Bellosillo B *et al*. Distinction between asymptomatic monoclonal B-cell lymphocytosis with cyclin D1 overexpression and mantle cell lymphoma: from molecular profiling to flow cytometry. *Clin Cancer Res* 2014;20:1007–1019.
- Royo C, Navarro A, Clot G *et al*. Non-nodal type of mantle cell lymphoma is a specific biological and clinical subgroup of the disease. *Leukemia* 2012;26:1895–1898.
- Nygren L, Baumgartner Wennerholm S, Klimkowska M *et al*. Prognostic role of SOX11 in a population-based cohort of mantle cell lymphoma. *Blood* 2012;119:4215–4223.
- Ferrando AA. SOX11 is a mantle cell lymphoma oncogene. *Blood* 2013;121:2169–2170.

- 13 Vegliante MC, Palomero J, Perez-Galan P *et al*. SOX11 regulates PAX5 expression and blocks terminal B-cell differentiation in aggressive mantle cell lymphoma. *Blood* 2013;121:2175–2185.
- 14 Nera KP, Kohonen P, Narvin E *et al*. Loss of Pax5 promotes plasma cell differentiation. *Immunity* 2006;24:283–293.
- 15 Shaffer AL, Lin KI, Kuo TC *et al*. Blimp-1 orchestrates plasma cell differentiation by extinguishing the mature B cell gene expression program. *Immunity* 2002;17:51–62.
- 16 Kallies A, Hasbold J, Fairfax K *et al*. Initiation of Plasma-cell differentiation is independent of transcription factor Blimp-1. *Immunity* 2007;26:555–566.
- 17 Busslinger M, Klix N, Pfeffer P *et al*. Deregulation of PAX-5 by translocation of the Emu enhancer of the IgH locus adjacent to two alternative PAX-5 promoters in a diffuse large-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:6129–6134.
- 18 Pasqualucci L, Compagno M, Houldsworth J *et al*. Inactivation of the PRDM1/BLIMP1 gene in diffuse large B cell lymphoma. *J Exp Med* 2006;203:311–317.
- 19 Tam W, Gomez M, Chadburn A *et al*. Mutational analysis of PRDM1 indicates a tumor-suppressor role in diffuse large B-cell lymphomas. *Blood* 2006;107:4090–4100.
- 20 Swerdlow SH, Campo E, Harris NL *et al*. WHO Classification of Tumors of Hematopoietic and Lymphoid Tissues, 4th (edn). IARC: Lyon, 2008, pp 194–195.
- 21 Lin P, Molina TJ, Cook JR *et al*. Lymphoplasmacytic lymphoma and other non-marginal zone lymphomas with plasmacytic differentiation. *Am J Clin Pathol* 2011;136:195–210.
- 22 Gradowski JF, Jaffe ES, Warnke RA *et al*. Follicular lymphomas with plasmacytic differentiation include two subtypes. *Mod Pathol* 2010;23:71–79.
- 23 Molina TJ, Lin P, Swerdlow SH *et al*. Marginal zone lymphomas with plasmacytic differentiation and related disorders. *Am J Clin Pathol* 2011;136:211–225.
- 24 Treon SP, Xu L, Yang G *et al*. MYD88 L265P somatic mutation in Waldenström's macroglobulinemia. *N Engl J Med* 2012;367:826–833.
- 25 Jiménez C, Sebastián E, Chillón MC *et al*. MYD88 L265P is a marker highly characteristic of, but not restricted to, Waldenström's macroglobulinemia. *Leukemia* 2013;27:1722–1728.
- 26 Ngo VN, Young RM, Schmitz R *et al*. Oncogenically active MYD88 mutations in human lymphoma. *Nature* 2011;470:115–119.
- 27 Hamadeh F, MacNamara SP, Aguilera NS *et al*. MYD88 L265P mutation analysis helps define nodal lymphoplasmacytic lymphoma. *Mod Pathol* 2014;28:564–574.
- 28 Martínez-Trillos A, Pinyol M, Navarro A *et al*. Mutations in TLR/MYD88 pathway identify a subset of young chronic lymphocytic leukemia patients with favorable outcome. *Blood* 2014;123:3790–3796.
- 29 Lennert K, Mohri N, Stein H *et al*. Malignant Lymphomas other than Hodgkin's disease. *Histology-Cytology-Ultrastructure-Immunology*. Springer-Verlag: Berlin Heidelberg: New York, 1978, pp 281–301.
- 30 Young KH, Chan WC, Fu K *et al*. Mantle cell lymphoma with plasma cell differentiation. *Am J Surg Pathol* 2006;30:954–961.
- 31 Naushad H, Choi WW, Page CJ *et al*. Mantle cell lymphoma with flow cytometric evidence of clonal plasmacytic differentiation: a case report. *Cytometry B Clin Cytom* 2009;76:218–224.
- 32 Visco C, Hoeller S, Malik JT *et al*. Molecular characteristics of mantle cell lymphoma presenting with clonal plasma cell component. *Am J Surg Pathol* 2011;35:177–189.
- 33 Perez-Galan P, Mora-Jensen H, Weniger MA *et al*. Bortezomib resistance in mantle cell lymphoma is associated with plasmacytic differentiation. *Blood* 2011;117:542–552.
- 34 Soldini D, Valera A, Sole C *et al*. Assessment of SOX11 expression in routine lymphoma tissue sections, characterization of new monoclonal antibodies for diagnosis of mantle cell lymphoma. *Am J Surg Pathol* 2014;38:86–93.
- 35 Xu L, Hunter ZR, Yang G *et al*. MYD88 L265P in Waldenström macroglobulinemia, immunoglobulin M monoclonal gammopathy, and other B-cell lymphoproliferative disorders using conventional and quantitative allele-specific polymerase chain reaction. *Blood* 2013;121:2051–2058.
- 36 Jaffe ES, Harris NL, Vardiman JW *et al*. *Hematopathology*, 1st (edn). Saunders/Elsevier: Philadelphia, 2011, pp 333–348.
- 37 Cooper CL, Joshua DE, Lee CS *et al*. Extranodal plasmablastic lymphoma arising in mantle cell lymphoma. *Histopathology* 2007;51:856–859.
- 38 Navarro A, Clot G, Royo C *et al*. Molecular subsets of mantle cell lymphoma defined by the IGHV mutational status and SOX11 expression have distinct biologic and clinical features. *Cancer Res* 2012;72:5307–5316.
- 39 Falini B, Fizzotti M, Pucciarini A *et al*. A monoclonal antibody (MUM1p) detects expression of the MUM1/IRF4 protein in a subset of germinal center B cells, plasma cells, and activated T cells. *Blood* 2000;95:2084–2092.
- 40 Martínez A, Pittaluga S, Rudelius M *et al*. Expression of the interferon regulatory factor 8/ICSBP-1 in human reactive lymphoid tissues and B-cell lymphomas: a novel germinal center marker. *Am J Surg Pathol* 2008;32:1190–1200.
- 41 Natkunam Y, Warnke RA, Montgomery K *et al*. Analysis of MUM1/IRF4 protein expression using tissue microarrays and immunohistochemistry. *Mod Pathol* 2001;14:686–694.
- 42 Gualco G, Weiss LM, Harrington WJ Jr *et al*. BCL6, MUM1, and CD10 expression in mantle cell lymphoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2010;18:103–108.
- 43 Montes-Moreno S, Gonzalez-Medina AR, Rodriguez-Pinilla SM *et al*. Aggressive large B-cell lymphoma with plasma cell differentiation: immunohistochemical characterization of plasmablastic lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma with partial plasmablastic phenotype. *Haematologica* 2010;95:1342–1349.
- 44 Ondrejka SL, Lin JJ, Warden DW *et al*. MYD88 L265P somatic mutation: its usefulness in the differential diagnosis of bone marrow involvement by B-cell lymphoproliferative disorders. *Am J Clin Pathol* 2013;140:387–394.
- 45 Beà S, Valdés-Mas R, Navarro A *et al*. Landscape of somatic mutations and clonal evolution in mantle cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013;110:18250–18255.
- 46 Poulain S, Roumier C, Decambon A *et al*. MYD88 L265P mutation in Waldenström macroglobulinemia. *Blood* 2013;121:4504–4511.

- 47 Capaldi IB, May AM, Schmitt-Graeff A *et al*. Detection of MYD88 L265P mutations in formalin-fixed and decalcified BM biopsies from patients with lymphoplasmacytic lymphoma. *Exp Mol Pathol* 2014;97:57–65.
- 48 Zhang J, Jima D, Moffitt AB *et al*. The genomic landscape of mantle cell lymphoma is related to the epigenetically determined chromatin state of normal B cells. *Blood* 2014;123:2988–2996.
- 49 Fonseca R, Blood EA, Oken MM *et al*. Myeloma and the t(11;14)(q13;q32); evidence for a biologically defined unique subset of patients. *Blood* 2002;99:3735–3741.
- 50 King RL, Howard MT, Hodnefield JM *et al*. IgM multiple myeloma: pathologic evaluation of a rare entity. *Am J Clin Pathol* 2013;140:519–524.
- 51 Chen YH, Gao J, Fan G *et al*. Nuclear expression of sox11 is highly associated with mantle cell lymphoma but is independent of t(11;14)(q13;q32) in non-mantle cell B-cell neoplasms. *Mod Pathol* 2010;23:105–112.
- 52 Zhang YH, Liu J, Dawlett M *et al*. The role of SOX11 immunostaining in confirming the diagnosis of mantle cell lymphoma on fine-needle aspiration samples. *Cancer Cytopathol* 2014;122:892–897.

Discusión

5. Discusión

El Linfoma de células del Manto (LCM) se caracteriza por ser un linfoma de presentación clínica agresiva caracterizada por una proliferación de linfocitos B maduros con una alteración molecular muy específica la t(11;14)(q13;q32), que llevará a la sobreexpresión de Ciclina D1 (1).

La mayoría de los casos de LCM están compuestos por células linfoides de aspecto homogéneo, de pequeño a mediano tamaño, con núcleos irregulares aunque también existen variantes de aspecto morfológico blastoide o pleomórfico (2). En la variedad blastoide los linfocitos neoplásicos son semejantes morfológicamente a linfoblastos presentando una cromatina nuclear dispersa y una alta actividad mitótica, mientras que la variedad pleomórfica presenta linfocitos pleomórficos con abundantes células neoplásicas grandes de núcleos ovales e irregulares, de pálido citoplasma y presencia de prominentes nucléolos en algunas de estas células grandes. Inmunohistoquímicamente el LCM expresa en su superficie marcadores de linfocitos B maduros, CD5 y característicamente sobreexpresa Ciclina D1 a nivel nuclear. En general resulta negativo a CD10 y BCL6 aunque positividad a estos marcadores se ha observado en algún caso de LCM de morfología blastoide o pleomórfica (2).

Varios estudios recientes demostraron la característica sobreexpresión del factor de transcripción SOX11 en el LCM. SOX11 es un factor de transcripción implicado en la neurogénesis embrionaria y su expresión específica en el LCM, incluidos los LCM Ciclina D1 negativos, hace que se le considere como un marcador de diagnóstico muy específico para este tipo de linfoma, aunque SOX11 también se puede expresar en otros linfomas como tricoleucemia, linfoma de Burkitt y neoplasias linfoides inmaduras (29-32).

El diagnóstico diferencial entre el Linfoma difuso de célula B grandes (LDCBG) CD5 positivos y LCM de las variedades morfológicas blastoide y pleomórfica pueden ser difícil en la práctica diaria. Varios grupos estudiaron la expresión de Ciclina D1 en LDCBG encontrando que hasta un 15% de estos tumores expresaban Ciclina D1, aunque en la inmensa mayoría de los casos no presentaban la t(11;14)(q13;q32) (26,40). Esta dificultad diagnóstica, encontrada en la práctica clínica indica la necesidad de buscar nuevos marcadores específicos para poder diferenciar las variedades morfológicas blastoide y pleomórfica del LCM y el LDCBG Ciclina D1 positivo.

En el primer manuscrito de esta Tesis estudiamos la frecuencia y las características del LDCBG Ciclina D1 positivo y la utilidad de SOX11 en el diagnóstico diferencial entre estos dos linfomas. Retrospectivamente se estudió la expresión inmunohistoquímica de Ciclina D1 en 206 LDCBG de Taiwán. Se observó que 3 casos (1.5%) resultaron positivos para Ciclina D1, con expresión nuclear de esta proteína en 60%, 30% y 50% de las células malignas respectivamente. Estos 3 casos de LDCBG presentaban el mismo inmunofenotipo del subtipo no-centro germinal B (non-GCB) con expresión de BCL2, BCL6 y IRF4/MUM1 pero negativos para CD5 y CD10. Los 3 LDCBG Ciclina D1 positivos resultaron negativos a SOX11. A la vez se estudio 22 LCM Ciclina D1 positivos, de los cuales 17/19 (89%) expresaron SOX11 nuclearmente. Los 2/19 (11%) LCM que resultaron negativos a SOX11 eran de la variedad de célula pequeña. La diferencia de expresión de SOX11 entre LDCBG Ciclina D1 positivo y LCM fue significativa $p=0.006$.

Una cohorte independiente de 98 casos de LDCBG también se estudio inmunohistoquímicamente y todos los casos resultaron negativos para SOX11. Un caso (1%) resulto positivo a Ciclina D1, con expresión nuclear en un 10% de las células tumorales. El fenotipo de este LDCBG Ciclina D1 positivo fue diferente a los 3 casos de Taiwán, con fenotipo centro germinal B (GCB), positivo para CD10, BCL6 y negativo para CD5, BCL2, IRF4/MUM1 y SOX11.

Este LDCBG Ciclina D1 positivo junto con los 3 casos de Taiwán, no tenían reordenamiento de *CCND1* o translocación *IGH/CCND1* por FISH. El no reordenamiento del gen *CCND1* o translocación *IGH/CCND1* por FISH en estos LDCBG Ciclina D1 positivos concuerda con los resultados de los estudios de varios grupos y confirma su valor en el diagnóstico diferencial de estos tumores (26,67-70).

En nuestro estudio también se observo que el LDCBG Ciclina D1 positivo suele ser CD5 negativo y presentar un inmunofenotipo del subtipo no-centro germinal B (non-GCB) con expresión positiva de BCL6 y IRF4/MUM1, resultando negativo a CD10 (como nuestros tres casos de Taiwán). Nuestros resultados concuerdan con los estudios realizados por otros grupos como Vela-Chávez *et al.* (26) y Ehinger *et al.*(40).

Recientemente Ok *et al.* (70) investigaron 30 casos LDCBG Ciclina D1 positivos y observaron que todos los casos eran también CD5 negativos y ningún caso demostró reordenamiento de *CCND1*. Interesantemente ellos encontraron más frecuentemente 17/30 56.7% LDCBG del tipo centro germinal B (GCB type) vs 13/30 43.3% del tipo célula B activada (ABC type) (70). Nosotros también identificamos en nuestra cohorte independiente un caso LDCBG Ciclina D1 positivo con fenotipo centro germinal B (GCB). De estos resultados se puede concluir que el LDCBG Ciclina D1 positivo suele ser inmunofenotípicamente CD5 negativo (26,40,68,69,70).

El factor de transcripción SOX11 también juega un papel importante en la linfomagénesis del LCM y ha sido indicado, en recientes estudios, como oncogén de este tipo de linfoma, incluso implicándolo en su curso clínico agresivo. La relación entre la ausencia de la expresión de SOX11 y el curso clínico indolente de algunos LCM se ha confirmado en varios estudios. También se ha observado un curso clínico agresivo en LCM SOX11 negativos. Sin embargo la mayoría de estos casos presentaban mutaciones del gen *TP53* (62-65).

El potencial oncogénico de SOX11 en el LCM se ha confirmado experimentalmente en estudios recientes. Uno de ellos mostró que xenoinjertos de LCM SOX11 positivos presentaban una sobreexpresión de genes angiogénicos y a la vez una mayor densidad microvascular en comparación con LCM SOX11 negativos, proponiendo el concepto que incrementos de la densidad microvascular se correlacionan con progresión de la enfermedad, como ocurre en otras neoplasias linfoides (61,71).

Un importante y reciente estudio experimental indicó el hecho de que el silenciamiento de SOX11 (SOX11-knockdown studies) conlleva una significativa reducción del crecimiento tumoral *in vivo* en líneas celulares xenoinjertadas de LCM (60,66). También se indicó en este estudio el hecho de que *PAX5* es uno de los genes directamente regulados por SOX11 en líneas celulares de LCM (60,66). *PAX5* es un importante factor de transcripción, esencial para la diferenciación de las células progenitoras linfoides a células de línea B manteniendo la identidad de las células B. La diferenciación de la célula B a una célula plasmática madura, requiere la supresión de su expresión.

El silenciamiento de SOX11 en líneas celulares de LCM resultó en una reducción de la expresión de PAX5 y un incremento de la expresión de los factores de transcripción BLIMP1 y XBP1. BLIMP1 y XBP1 son factores de transcripción esenciales y fundamentales para el proceso de la diferenciación plasmática en la célula B. En cambio, la expresión del factor de transcripción IRF4/MUM1 no varió en relación a la modulación de SOX11. En este estudio, se demostró que la modulación de SOX11 conlleva a un cambio en la expresión del perfil genético y fenotípico, desde el perfil de célula B madura a una célula con diferenciación plasmática inicial (60,66).

Estos resultados sugieren el hecho de que SOX11 puede contribuir a la limfomagénesis del LCM bloqueando el programa de diferenciación terminal de las células B. Sin embargo, se desconocía si en LCM primarios, la modulación de la expresión de SOX11 podía cambiar las características morfológicas e inmunofenotípicas del LCM primario, con respecto a la diferenciación terminal de la célula B.

En el segundo manuscrito de esta Tesis doctoral hemos investigado y estudiado este punto para comprobar si la modulación de la expresión de SOX11 puede afectar el programa de diferenciación terminal de las células B en el LCM primario. En este segundo manuscrito se ha revisado y estudiado 60 casos de LCM primario. Todos estos casos podían ser diagnosticados como LCM en base a su morfología e inmunofenotipo. En todos los casos se comprobó una sobreexpresión nuclear de la proteína Ciclina D1 inmunohistoquímicamente. Los casos eran PAX5 positivos en la población linfocítica tumoral atípica y en los 18 casos estudiados se confirmó la presencia de la $t(11;14)(q13;q32)$ por estudios de FISH convencionales. Un caso había sido incluido en un estudio previo por Visco *et al.* (Caso número 6) (13). La expresión inmunohistoquímica nuclear de la proteína SOX11 estaba presente en 41 casos mientras en 19 casos resultaron SOX11 negativos. La expresión de ARNm de SOX11 fue investigada por PCR cuantitativa en 23 LCM, 15 SOX11-positivos y 8 SOX11-negativos y los niveles de ARNm se correlacionaban con la expresión inmunohistoquímica de la proteína SOX11 como previamente se había descrito (72).

Morfológicamente el LCM clásico se ha descrito como un linfoma constituido por una proliferación monótona de linfocitos de pequeño a mediano tamaño, con núcleos irregulares, en el que normalmente no se observa diferenciación plasmática. Diversos tipos de LCM

están descritos en relación a su aspecto morfológico: clásico, célula pequeña, monocitoide, blastoide y pleomórfico.

En nuestro estudio observamos que la variante de célula pequeña se observó en 11/19 (58%) de nuestros LCM SOX11-negativos. Esta variante se ha descrito como un linfoma constituido por linfocitos pequeños, con núcleos redondos de densa cromatina, escaso citoplasma, imitando al linfoma linfocítico de células pequeñas, pero no se observan en esta variante centros de proliferación, prolinfocitos y parainmunoblastos (73). Solo 1/41 (2%) de los SOX11-positivos presentó la variedad de célula pequeña ($p < 0.001$).

En cambio, la variedad clásica fue la variedad morfológica más frecuentemente observada en los SOX11-positivos con 33/41 (81%) de esta variedad. La variedad morfológica clásica se observó en 7/19 (37%) SOX11-negativos ($p = 0.002$). Entre los dos grupos no se observó diferencias estadísticamente significativas en relación al número de casos de las variedades blastoide/pleomórfica.

Desde el punto de vista clínico, los LCM primarios SOX11-negativos de nuestro estudio tuvieron más frecuentemente una presentación no nodal 15/19 (79%) vs 8/41 (20%) de los SOX11-positivos ($p < 0.001$). Una expresión leucémica se observó en 11/12 (92%) de los casos SOX11-negativos y en 21/28 (75%) de los casos SOX11-positivos. La médula ósea estaba frecuentemente infiltrada en ambos grupos: 11/11 (100%) en los SOX11-negativos vs 25/28 (89%) en los SOX11-positivos. No se observaron lesiones líticas o hipercalcemia en ningún caso de los 60 LCM primarios.

En nuestro estudio los LCM SOX11-negativos presentaron un curso clínico más indolente que los LCM SOX11-positivos; al considerar que un menor número de casos SOX11-negativos necesitaron quimioterapia en el momento del diagnóstico 5/14 (36%) vs 27/28 (96%) ($p < 0.001$). La mediana de supervivencia global en meses fue también más larga en los pacientes SOX11-negativos comparada con los SOX11-positivos (103 meses, 64–141 vs 44 meses, 24–64, $p = 0.024$).

También se observó que los casos SOX11-negativos presentaban más frecuentemente mutaciones en la región *IGHV*: 7/11 (64%) vs 1/25 (4%) ($p < 0.001$). Esta clínica y características moleculares más indolentes observadas en los casos SOX11-negativos, concuerda con los resultados de los estudios inmunohistoquímicos del índice de proliferación del marcador Ki67, donde se observó una proliferación menor en los casos SOX11-negativos ($20 \pm \text{s.d. } 18$ vs $34.5 \pm \text{s.d. } 23$, $p = 0.017$).

La presencia de células plasmáticas politípicas, acompañando la población linfóide maligna, estaba presente en la mayoría de los casos estudiados, independientemente de su expresión de SOX11. En cambio se observó la presencia de una población de células plasmáticas monotípicas acompañadas de un número variable y focal de células linfoides con diferenciación plasmática 7/19 (37%) de los casos SOX11-negativos. Esta diferenciación plasmática no se observó en ningún caso SOX11-positivo ($p < 0.001$). Los 7 casos presentaban un componente linfóide atípico concordante con un LCM, los casos eran positivos para PAX5 en su componente linfóide atípico pero PAX5 negativos en las células plasmáticas monotípicas. Tres pacientes presentaron un componente IgM monoclonal en sangre. La presencia de la $t(11;14)(q13;q32)$ se confirmó en los cuatro casos donde se examinó. Previamente un quinto caso la $t(11;14)(q13;q32)$ se había confirmado en el estudio por Visco *et al.* (Caso número 6) (13).

De estos 7 casos SOX11-negativos con diferenciación plasmática 3/5 (60%) fueron IgD positivos y 4/7 (57%) fueron CD5 positivos. Las células plasmáticas monotípicas se observaron en 3 casos esplénicos, 3 casos nodales y un caso de afectación periorbital. En los casos esplénicos se observó que la población plasmática monotípica formaba pequeños agregados peritrabeculares y periarteriolas. En los casos de afectación nodal y periorbitaria las células plasmáticas monotípicas y las células linfoplasmocíticas presentaron una distribución difusa, mezclándose con el componente linfóide atípico. De estos 7 casos con diferenciación plasmática, 3 casos presentaron cuerpos de Dutcher (inclusiones intranucleares de carácter inmunoglobulínico).

Dada la diferenciación plasmocelular se investigó si existía la mutación *MYD88* L256P en 9 casos SOX11-negativos incluidos los 7 casos con diferenciación plasmática focal y 7 casos SOX11-positivos. El LCM SOX11-negativo con la mutación *MYD88* L256P tenía una presentación nodal con centros germinales reactivos persistentes. Se observó la presencia de las células plasmáticas monotípicas y células con los cuerpos de Dutcher en las zonas del manto de los centros germinales reactivos. En este caso, la expresión de la proteína Ciclina D1 era fácilmente demostrable tanto en las células plasmáticas monotípicas como en las células con los cuerpos de Dutcher. La presencia de la t(11;14)(q13;q32) fue confirmada por estudios de FISH.

Con los estudios inmunohistoquímicos observamos que 11/19 (58%) de los LCM SOX11-negativos, incluyendo los 7 casos con células plasmáticas monotípicas, presentaban una expresión intensa citoplasmática de una cadena ligera vs 5/39 (13%) de los SOX11-positivos ($p=0.001$). En 3 casos de los 7 con diferenciación plasmática, también se pudo realizar estudios de citometría de flujo, confirmando la misma restricción de cadena ligera de superficie en los linfocitos tumorales que la restricción de cadena ligera citoplasmática observada en las células plasmáticas monotípicas mediante estudios inmunohistoquímicos.

Para completar el estudio sobre la diferenciación plasmática en LCM primario, se realizaron estudios inmunohistoquímicos de los factores de transcripción IRF4/MUM1, BLIMP1 y XBP1. Se consideró positiva la expresión de estos factores de transcripción cuando presentaban una expresión protéica intranuclear intensa en $\geq 10\%$ células tumorales en una área tumoral representativa.

IRF4/MUM1 fue positivo en 10/19 (53%) de los casos SOX11-negativos y en 18/40 (45%) de los casos SOX11-positivos, no encontrándose diferencias significativas entre los dos subgrupos ($p=0.705$). IRF4/MUM1 fue intensamente positivo en las células plasmáticas monotípicas y linfoplasmocíticas de los 7 casos SOX11-negativos y también se comprobó que su patrón de expresión era formando grandes agregados nodulares en la población linfoide atípica de los dos subgrupos de LCM estudiados.

El factor de transcripción de diferenciación plasmática BLIMP1 fue más frecuentemente expresado en los casos SOX11-negativos que los casos SOX11-positivos 15/18 (83%) vs 13/38 (34%) ($p=0.001$). La media del porcentaje del número de células linfoides tumorales positivas en cada caso, también fué mayor en los casos SOX11-negativos comparado con los SOX11-positivos (media 26% \pm s.d. 23) vs (media 13% \pm s.d.19) ($p<0.04$). BLIMP1 se expresaba no solo en las células plasmáticas y linfoplasmocíticas sino también en la población linfoide atípica sin diferenciación plasmática morfológica. Los casos con mayor número de células positivas tenían tendencia a presentar un patrón difuso, mientras que los casos con menor número de células positivas, presentaban un patrón más nodular.

Finalmente para completar la investigación; estudiamos la expresión proteica del factor de transcripción XBP1. Al igual que BLIMP1, la expresión nuclear de XBP1 fue más frecuente en los casos SOX11-negativos que los casos SOX11-positivos 12/16 (75%) vs 4/38 (11%) ($p<0.001$). Al igual que BLIMP1, la media del porcentaje del número de células linfoides tumorales positivas por caso, fué mayor en los casos SOX11-negativos que en los SOX11-positivos, aunque el número de células XBP1 positivas era casi siempre menor al de las células positivas a BLIMP1. Sin embargo BLIMP1 y XBP1 presentaron una distribución topográfica similar (media 12% \pm s.d. 10 vs media 3% \pm s.d. 4) ($p<0.004$).

En resumen, en este segundo manuscrito hemos investigado detalladamente 60 LCM primarios, para poder observar si la modulación de la expresión del factor de transcripción SOX11 puede afectar el programa de diferenciación terminal de las células B en el LCM primario. La diferenciación plasmática es un fenómeno que se observa en diferentes tipos de Linfoma B de célula pequeña; es el elemento esencial de la definición del LPL pero también puede observarse en cierto grado en LZM, LF, LLC (8-10,74). Al contrario que en otros tipos de Linfoma B de célula pequeña, el LCM normalmente no presenta diferenciación plasmática aunque diversos estudios recientes han demostrado la presencia de diferenciación plasmática focal con presencia de células plasmáticas monotípicas clonalmente relacionadas al LCM (11-13).

El programa de diferenciación plasmática es un complejo proceso coordinado por las acciones de diversos factores de transcripción, principalmente los factores PAX5, IRF4/MUM1, BLIMP1 y XBP1 (38,41,42,47,55). Como se ha mencionado previamente, un estudio experimental en líneas celulares de LCM indicó que el silenciamiento de SOX11 conlleva a un cambio en la expresión del perfil genético y fenotípico desde el perfil de célula B madura a un perfil de célula con diferenciación plasmática inicial (60).

En los 7 casos, la intensa sobreexpresión de la proteína nuclear Ciclina D1 se identificó fácilmente en las poblaciones de células plasmáticas monotípicas y células linfoplasmocíticas con cuerpos de Dutcher, indicando que se trataba de un componente celular del LCM.

En los 3 casos que se pudo realizar citometría de flujo, se observó que los linfocitos atípicos presentaban la misma restricción de cadena ligera en superficie, que la cadena ligera que se observaba inmunohistoquímicamente en el citoplasma de la población de células plasmáticas monotípicas, sugiriendo que el LCM y la población de células plasmáticas monotípicas formaban parte del mismo tumor. En un caso esplénico, la relación clonal entre las células plasmáticas monotípicas y las células del LCM había sido demostrada molecularmente mediante estudios de reordenamiento de *IGH* (13).

La clínica y la presentación patológica de estos 7 casos tenían similitudes con los 8 casos, previamente descritos, de LCM con células clonales plasmáticas (11-13). La presentación nodal es frecuente, aunque también pueden presentarse como linfomas esplénicos o extra nodales (periorbital). Suelen presentar infiltración de la médula ósea al momento del diagnóstico y un componente IgM monoclonal en sangre. Las células linfoides neoplásicas corresponden morfológicamente en su mayoría a LCM clásicos Ciclina D1 y CD5 positivos. Linfocitos atípicos CD5 positivos presentan la misma restricción de cadena ligera en superficie, que la cadena ligera que se observa en el citoplasma de la población de células plasmáticas monotípicas, sugiriendo que el LCM y la población de células plasmáticas monotípicas forman parte del mismo tumor. Incluso las células plasmáticas clonales pueden retener la expresión de CD5 como Naushad *et al.* (12) demostró mediante estudios de citometría de flujo.

En los casos nodales y extra nodales las células plasmáticas monotípicas suelen presentar un patrón difuso mezclándose con el componente linfoide atípico. En algunos casos se puede observar LCM con patrón de crecimiento de zona del manto y presencia de centros germinales reactivos. Las células neoplásicas claramente positivas a Ciclina D1 expanden la zona del manto como demostraron Young *et al.* (Caso número 2) (11) y Visco *et al.* (Casos número 2 y 4) (13).

Este patrón de crecimiento de zona del manto es concordante con nuestro caso SOX11-negativo con la mutación *MYD88* L256P. Este caso nodal presentó múltiples centros germinales reactivos persistentes, con la presencia de células plasmáticas monotípicas y células con cuerpos de Dutcher Ciclina D1 positivas en las zonas del manto.

Un caso excepcional fué presentado por Cooper *et al.* (75) en el cual se observó diferenciación plasmablástica en la transformación de un LCM clásico. En este caso se estudio un LCM clásico CD5 y Ciclina D1 positivo transformándose a Linfoma Plasmablástico. Mediante estudios de PCR del gen *IGH* se observó una banda monoclonal idéntica en los dos linfomas y la presencia de la t(11;14)(q13;q32) se confirmó en los dos componentes mediante FISH. Estos hallazgos confirman la relación clonal entre los dos linfomas.

En los 3 casos en los cuales pudimos estudiar el estado mutacional de *IGHV* se presentaba un bajo nivel de identidad en relación con la línea germinal (<2%), indicando que estos linfomas derivaban de células que habían experimentado el microambiente centro germinal. Navarro *et al.* (33) demostraron que esta característica es común en los LCM SOX11-negativos. En su estudio observaron que LCM con presentación no nodal, *IGHV* mutado y negativos a SOX11 correspondían a un subtipo más indolente (33).

El curso clínico de nuestros 7 casos de LCM con diferenciación plasmocelular fue indolente ya que ningún paciente necesitó quimioterapia hasta pasados ya como mínimo 2 años, desde el momento del diagnóstico. Este hallazgo concuerda con el curso clínico observado en el resto de nuestros LCM SOX11-negativos.

En nuestro estudio estos pacientes presentaron un curso clínico más indolente que los LCM SOX11-positivos; al considerar que un menor número de pacientes necesitaron quimioterapia al momento del diagnóstico (36%) vs (96%) ($p < 0.001$). Además la mediana de supervivencia global en meses, fue más larga en los pacientes SOX11-negativos comparada con los SOX11-positivos (103 meses, 64–141 vs 44 meses, 24–64, $p = 0.024$).

Este comportamiento es similar al descrito en previos estudios de LCM SOX11-negativos (62-64,76,77). En cambio, otros estudios indican la posibilidad de que la ausencia de SOX11 conlleve a un curso clínico más agresivo (65,78).

Desde hace tiempo se reconoce la existencia del LCM de curso indolente, con larga supervivencia y sin necesidad de tratamiento con quimioterapia. La presencia de la $t(11;14)(q13;q32)$ indicaba que se trataba de un subtipo de LCM y no una LLC (79).

La posible implicación de SOX11 en el curso clínico agresivo del LCM fue inicialmente sugerida al observar que SOX11 era uno de los genes intensamente expresado en los LCM que requerían tratamiento en el momento del diagnóstico en comparación con aquellos linfomas que tenían un curso clínico indolente.

En un estudio revelador y muy extenso Fernández *et al.* (62) investigaron la expresión inmunohistoquímica de SOX11 en 112 pacientes con LCM. Se observó una expresión positiva en 97(87%) de los tumores mientras que 15(13%) resultaron negativos. Los pacientes SOX11 negativos tuvieron una presentación clínica más frecuentemente no nodal con afectación leucémica. La supervivencia en 5 años fue mejor en los pacientes SOX11-negativos que en los SOX11-positivos (5-year OS, 78% (95% CI, 56–100) vs 36% (95% CI, 25–47) ($p = 0.001$) (62). Por tanto las diferencias entre los dos grupos fueron estadísticamente significativas. Además mediante estudios de SNP arrays se observó que los LCM clínicamente indolentes no presentaban ni cariotipos complejos ni alteraciones de los genes *ATM*, *CDKN2A* y *TP53* (62).

La existencia de un subtipo de LCM indolente con presentación no-nodal, afectación leucémica, estado hipermutado de *IGHV* y SOX11 negativo fue confirmada en posteriores estudios por diferentes grupos (63,64,76,77). Aunque Royo *et al.* (63) han sugerido que la presencia de alteraciones cromosómicas de 17p/*TP53* en LCM indolentes influyen negativamente en la supervivencia de estos pacientes.

En cambio hay estudios donde la negatividad del factor de transcripción SOX11 se considera un factor de pronóstico adverso (65,78). Nygren *et al.* (65) estudiaron una cohorte de 186 casos de LCM y observaron una supervivencia mejor en los casos SOX11 positivos en comparación con los casos SOX11 negativos. La mediana de la supervivencia global fue 1.5 años (494 días) para los pacientes SOX11-negativos vs 3.2 años (1180 días) para los pacientes con expresión SOX11 positiva en los tumores ($p=0.014$).

Es importante indicar que existen diferencias fundamentales entre los estudios de Nygren *et al.* (65) y Meggendorfer *et al.* (78) y los estudios en los cuales se observó una mejor supervivencia global en los casos SOX11 negativos. La primera de estas diferencias es que la mayoría de los casos SOX11 positivos tienen una presentación clínica nodal, mientras que la mayoría de los casos SOX11 negativos son no-nodales (esplénicos). La segunda diferencia importante es que además presentan la proteína p53 mutada.

En su estudio, Nygren *et al.* (65), encontraron que 69% de los LCM SOX11-negativos resultaron intensamente positivos a p53 vs solo 16% en los SOX11-positivos ($p<0.001$). Los casos de LCM que fueron considerados positivos a p53 tenían una expresión intensa inmunohistoquímicamente en más de 20% de las células tumorales y estos casos se correlacionaban a su vez con una peor supervivencia global. La expresión inmunohistoquímica de p53 en estos casos SOX11 negativos es un dato importante ya que una expresión intensa inmunohistoquímica es frecuentemente indicativa de mutación del gen *TP53*. Esto da lugar a una proteína p53 no funcionante y se considera un marcador de pronóstico negativo en el LCM (5,80,81). Por tanto, la presentación clínica y el estado del gen *TP53* son dos importantes factores que pueden explicar las diferencias en las supervivencias globales entre los LCM SOX11 negativos.

Para completar nuestros estudios inmunohistoquímicos sobre la diferenciación plasmática en LCM primarios, documentamos la expresión citoplasmática de las cadenas ligeras de las inmunoglobulinas, observando que un 58% de los LCM SOX11-negativos, incluyendo los 7 casos con células plasmáticas monotípicas, presentaban una expresión intensa citoplasmática de una cadena y por tanto una restricción de una cadena ligera vs 13% de los LCM SOX11-positivos. También se realizaron estudios inmunohistoquímicos de los factores de transcripción IRF4/MUM1, BLIMP1 y XBP1.

Con respecto IRF4/MUM1, no se observaron diferencias significativas entre los dos grupos (53% vs 45%). Esta observación es concordante con el hallazgo previamente observado que el silenciamiento de SOX11 en líneas celulares de LCM, no modula el estado del factor de transcripción IRF4/MUM1, lo cual sugiere que su regulación es independiente de la modulación de SOX11 en el LCM (60).

En cambio si se observaron diferencias significativas entre los dos grupos diferentes de LCM, con respecto a los factores de transcripción BLIMP1 y XBP1. Tanto BLIMP1 como XBP1 fueron más frecuentemente sobreexpresados en los casos SOX11-negativos que los casos SOX11-positivos (83% vs 34% y 75% vs 11%, respectivamente). Estos resultados concuerdan con el estudio previo experimental donde el silenciamiento de SOX11 en líneas celulares de LCM, conllevó a una reducción de la expresión del factor de transcripción PAX5 pero si demostró un incremento de la expresión de los factores de transcripción BLIMP1 y XBP1 (60).

En el día a día del trabajo del anatomopatólogo, el diagnóstico diferencial entre los linfomas B de célula pequeña que presentan diferenciación plasmática puede ser complejo, difícil y conlleva a considerar varias entidades como el LPL, LLC, LF y LZM. El LCM también debe incluirse en este diagnóstico diferencial. La presencia de t(11;14)(q13;q32), la sobreexpresión nuclear de la proteína Ciclina D1, la expresión positiva de CD5 y IgD, son características que apoyan el diagnóstico de LCM. En nuestro estudio, los LCM con diferenciación plasmática fueron positivos a IgD y CD5 (60% y 57% respectivamente).

También debe excluirse el mieloma de célula plasmática con presencia de la $t(11;14)(q13;q32)$ (27,28). Para esto se debe considerar que los LCM con diferenciación plasmática son CD5 positivos mayoritariamente y tienen tendencia a presentar múltiples linfadenopatías, afectación leucémica y no demuestran evidencia de lesiones líticas óseas o hipercalcemia. Todas estas características son poco usuales en el mieloma de célula plasmática.

Por tanto en el diagnóstico diferencial entre LCM con diferenciación plasmática y otros Linfomas B de célula pequeña hay que considerar principalmente dos identidades: LPL y LZM. En el LPL la diferenciación plasmática es esencial y parte fundamental de este tipo de linfoma. El LPL se caracteriza por estar compuesto por linfocitos de pequeño tamaño. Su componente celular puede tener un espectro que va desde linfocitos pequeños con escasa diferenciación plasmocitoide a células plasmáticas, variando la cantidad de linfocitos plasmocitoides y células plasmáticas presentes.

La mayoría de estos pacientes presentan una paraproteína sérica IgM monoclonal y es frecuente encontrar en el LPL la presencia de Cuerpos de Dutcher (pseudoinclusiones intranucleares) en los linfocitos plasmocitoides (7,8). El hecho de que el LPL resulta negativo a CD5, Ciclina D1 y no presenta la $t(11;14)(q13;q32)$ nos permite diferenciarlo del LCM con diferenciación plasmática (7,8). Recientemente la mutación L265P *MYD88* ha sido reconocida como muy característica de la Macroglobulinemia de Waldenström/ LPL (14), aunque esta mutación puede estar presente en otro tipo de Linfomas como LDCBG de tipo célula B activada (en un 14–29% de los casos), LLC (3%) y en algunos LZM (7%) (15-18).

El LZM se caracteriza por ser un linfoma de célula madura B con un infiltrado parafolicular en el cual los linfocitos pequeños neoplásicos tienen una apariencia heterogénea monocitoide, centrocítica y plasmocitoide. Estos linfocitos atípicos suelen estar mezclados con un número variable de linfocitos transformados o blastos. Se pueden observar también Cuerpos de Dutcher y un componente monoclonal en sangre periférica aunque con menor frecuencia que en el LPL. Inmunofenotípicamente el LZM no expresa la proteína nuclear Ciclina D1 y la mayoría suelen ser CD5 o IgD negativos (aunque algunos casos pueden ser débilmente IgD positivos) y no presentan la $t(11;14)(q13;q32)$ (82).

La presencia de la mutación L265P *MYD88* en uno de nuestros casos LCM con diferenciación plasmática es sorprendente, ya que los estudios de esta mutación han resultado negativos en más de los 100 casos de LCM estudiados y también resultaron negativos en los otros 6 casos de LCM con diferenciación plasmática y células plasmáticas monotípicas de nuestro estudio (19-23). En nuestro caso con la mutación L265P *MYD88*, las células linfoplasmocitoides con los cuerpos de Dutcher y las células plasmáticas monotípicas resultaron claramente positivas a la proteína nuclear Ciclina D1.

Además este linfoma presentaba la t(11;14)(q13;q32) en la gran mayoría de las células linfoides tumorales en los estudios de FISH, apoyando el diagnóstico de LCM y excluyendo el diagnóstico de LPL o LZM. Por ende las células linfoides tumorales Ciclina D1 positivas presentaban una clara distribución en la zona del manto de centros germinales reactivos persistentes, siendo éste un patrón altamente sugestivo de un LCM.

Por tanto, el LCM también debe incluirse en el diagnóstico diferencial de Linfomas de célula B pequeña con diferenciación plasmática, pues el reconocimiento de estos casos, puede tener importantes implicaciones clínicas con relación al tratamiento, como por ejemplo el tratamiento con Bortezomib (83).

En resumen, en esta Tesis doctoral hemos estudiado el posible papel que juega el factor de transcripción SOX11 en el LCM. En el primer manuscrito hemos confirmado que el factor de transcripción SOX11 es altamente específico del LCM, lo cual nos permite utilizarlo como un marcador muy útil en el diagnóstico diferencial con LDCBG que expresa Ciclina D1.

En el segundo manuscrito de esta Tesis hemos observado que el subtipo de LCM SOX11 negativo presenta más frecuentemente características y fenotipos de célula B con diferenciación terminal y con un curso clínico más indolente. También hemos investigado y confirmado en este segundo manuscrito, que la ausencia de este factor de transcripción en el LCM primario puede facilitar la progresión de las células B hacia la diferenciación plasmática terminal y por tanto este subtipo de Linfoma debe de incluirse a la hora de realizar el diagnóstico diferencial entre los diferentes tipos de Linfoma B con diferenciación plasmática.

Conclusiones

6. Conclusiones

Las principales conclusiones de esta Tesis son:

Manuscrito I:

1. La proteína Ciclina D1 se expresa en un 1.5% de Linfomas difusos de célula B grandes y esta expresión plantea el diagnóstico diferencial con el Linfoma de células del manto de variante pleomórfica o blastoide.
2. El estudio inmunohistoquímico de SOX11 puede ser de utilidad en el diagnóstico diferencial entre estas dos entidades ya que es positivo en la mayoría de los LCM pero es negativo en los LDCBG que expresan Ciclina D1.
3. El estudio de la t(11;14)(q13;q32) por FISH también puede ser de ayuda en el diagnóstico diferencial entre estas entidades ya que está presente en el LCM y no en el LDCBG Ciclina D1 positivo. La ausencia de la t(11;14)(q13;q32) en el LDCBG Ciclina D1 positivo indica que otros mecanismos celulares pueden estar implicados en la expresión de Ciclina D1 en estos tumores.

Manuscrito II:

1. El subtipo de Linfoma de células del manto SOX11 negativo presenta más frecuentemente características y fenotipos de célula B con diferenciación terminal. La ausencia de este factor de transcripción en el LCM puede facilitar la progresión de las células B hacia la diferenciación plasmática terminal en tumores primarios o como se ha demostrado en estudios experimentales en líneas celulares.
2. El subtipo de LCM SOX11 negativo esta caracterizado por la presencia de diferenciación morfológica plasmocelular, mayor expresión de inmunoglobulina citoplasmática y la expresión de factores de transcripción relacionados con esta diferenciación como BLIMP1 y XBP1.
3. La presencia de células plasmáticas clonales en el LCM plantea el diagnóstico diferencial con los otros tipos de Linfoma B con diferenciación plasmática. La expresión de Ciclina D1 y la presencia de la t(11;14)(q13;q32) facilitan el diagnóstico de LCM.
4. El LCM SOX11 negativo con diferenciación plasmática tiene un curso clínico indolente y esto puede plantear una actitud terapéutica más conservadora.
5. Las mutaciones de *MYD88* son poco frecuentes en el LCM con diferenciación plasmocelular. El hallazgo de esta mutación en uno de nuestros casos limita su valor en el diagnostico diferencial entre el LCM y los otros tipos de Linfoma B que presentan diferenciación plasmática.

Referencias Bibliográficas

7. Referencias Bibliográficas

Referencias Bibliográficas

(1) Jares P, Colomer D, Campo E. Molecular pathogenesis of mantle cell lymphoma. *J Clin Invest* 2012;122:3416-23.

(2) Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. WHO Classification of Tumors of Hematopoietic and Lymphoid Tissues. 4th ed. IARC: Lyon; 2008, pp 229-232.

(3) Klapper W, Hoster E, Determann O, et al. Ki-67 as a prognostic marker in mantle cell lymphoma-consensus guidelines of the pathology panel of the European MCL Network. *J Hematop* 2009; 2:103-111.

(4) Tiemann M, Schrader C, Klapper W, et al. Histopathology, cell proliferation indices and clinical outcome in 304 patients with mantle cell lymphoma (MCL): a clinicopathological study from the European MCL Network. *Br J Haematol* 2005;131:29-38.

(5) Greiner TC, Moynihan MJ, Chan WC, et al. p53 mutations in mantle cell lymphoma are associated with variant cytology and predict a poor prognosis. *Blood* 1996;87:4302-10.

(6) Dreyling M, Ferrero S, Hermine O. How to manage mantle cell lymphoma. *Leukemia* 2014;28:2117-30.

(7) Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. WHO Classification of Tumors of Hematopoietic and Lymphoid Tissues. 4th ed. IARC: Lyon; 2008, pp 194-195.

(8) Jaffe ES, Harris NL, Vardiman JW, et al. Hematopathology. 1st ed. Saunders/Elsevier: Philadelphia; 2011, pp 221-246.

(9) Lin P, Molina TJ, Cook JR, et al. Lymphoplasmacytic lymphoma and other non-marginal zone lymphomas with plasmacytic differentiation. *Am J Clin Pathol* 2011;136:195-210.

(10) Molina TJ, Lin P, Swerdlow SH, et al. Marginal zone lymphomas with plasmacytic differentiation and related disorders. *Am J Clin Pathol* 2011;136:211-25.

- (11) Young KH, Chan WC, Fu K, et al. Mantle cell lymphoma with plasma cell differentiation. *Am J Surg Pathol* 2006;30:954-61.
- (12) Naushad H, Choi WW, Page CJ, et al. Mantle cell lymphoma with flow cytometric evidence of clonal plasmacytic differentiation: a case report. *Cytometry B Clin Cytom* 2009;76:218-24.
- (13) Visco C, Hoeller S, Malik JT, et al. Molecular characteristics of mantle cell lymphoma presenting with clonal plasma cell component. *Am J Surg Pathol* 2011;35:177-89.
- (14) Treon SP, Xu L, Yang G, et al. MYD88 L265P somatic mutation in Waldenström's macroglobulinemia. *N Engl J Med* 2012;367:826-33.
- (15) Jiménez C, Sebastián E, Chillón MC, et al. MYD88 L265P is a marker highly characteristic of, but not restricted to, Waldenström's macroglobulinemia. *Leukemia* 2013;27:1722-8.
- (16) Ngo VN, Young RM, Schmitz R, et al. Oncogenically active MYD88 mutations in human lymphoma. *Nature* 2011;470:115-9.
- (17) Hamadeh F, MacNamara SP, Aguilera NS, et al. MYD88 L265P mutation analysis helps define nodal lymphoplasmacytic lymphoma. *Mod Pathol* 2015;28:564-74.
- (18) Martínez-Trillos A, Pinyol M, Navarro A, et al. Mutations in TLR/MYD88 pathway identify a subset of young chronic lymphocytic leukemia patients with favorable outcome. *Blood* 2014;123:3790-6.
- (19) Ondrejka SL, Lin JJ, Warden DW, et al. MYD88 L265P somatic mutation: its usefulness in the differential diagnosis of bone marrow involvement by B-cell lymphoproliferative disorders. *Am J Clin Pathol* 2013;140:387-94.
- (20) Beà S, Valdés-Mas R, Navarro A, et al. Landscape of somatic mutations and clonal evolution in mantle cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110:18250-5.

- (21)Poulain S, Roumier C, Decambron A, et al. MYD88 L265P mutation in Waldenstrom macroglobulinemia. *Blood* 2013;121:4504-11.
- (22)Capaldi IB, May AM, Schmitt-Graeff A, et al. Detection of MYD88 L265P mutations in formalin-fixed and decalcified BM biopsies from patients with lymphoplasmacytic lymphoma. *Exp Mol Pathol* 2014;97:57-65.
- (23)Zhang J, Jima D, Moffitt AB, et al. The genomic landscape of mantle cell lymphoma is related to the epigenetically determined chromatin state of normal B cells. *Blood* 2014;123:2988-96.
- (24)Fernandez V, Hartmann E, Ott G, et al. Pathogenesis of mantle-cell lymphoma: all oncogenic roads lead to dysregulation of cell cycle and DNA damage response pathways. *J Clin Oncol* 2005;23:6364-9.
- (25)Jares P, Colomer D, Campo E. Genetic and molecular pathogenesis of mantle cell lymphoma: perspectives for new targeted therapeutics. *Nat Rev Cancer* 2007;7:750-62.
- (26)Vela-Chavez T, Adam P, Kremer M, et al. Cyclin D1 positive diffuse large B-cell lymphoma is a post-germinal center-type lymphoma without alterations in the CCND1 gene locus. *Leuk Lymphoma* 2011; 52:458-66.
- (27)Fonseca R, Blood EA, Oken MM et al. Myeloma and the t(11;14)(q13;q32); evidence for a biologically defined unique subset of patients. *Blood* 2002;99:3735-41.
- (28)King RL, Howard MT, Hodnefield JM, et al. IgM multiple myeloma: pathologic evaluation of a rare entity. *Am J Clin Pathol* 2013;140:519-24.
- (29)Ek S, Dictor M, Jerkeman M, et al. Nuclear expression of the non B-cell lineage Sox11 transcription factor identifies mantle cell lymphoma. *Blood* 2008;111:800-5.
- (30)Dictor M, Ek S, Sundberg M, et al. Strong lymphoid nuclear expression of SOX11 transcription factor defines lymphoblastic neoplasms, mantle cell lymphoma and Burkitt's lymphoma. *Haematologica* 2009;94:1563-8.
- (31)Xu W, Li JY. SOX11 expression in mantle cell lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2010;51:1962-7.

- (32)Mozos A, Royo C, Hartmann E, et al. SOX11 expression is highly specific for mantle cell lymphoma and identifies the cyclin D1-negative subtype. *Haematologica* 2009;94:1555-62.
- (33)Navarro A, Clot G, Royo C, et al. Molecular subsets of mantle cell lymphoma defined by the IGHV mutational status and SOX11 expression have distinct biologic and clinical features. *Cancer Res* 2012;72:5307-16.
- (34)Obrador-Hevia A, Fernández de Mattos S ,Villalonga P et al. Molecular biology of mantle cell lymphoma: From profiling studies to new therapeutic strategies. *Blood Rev* 2009;23:205–16.
- (35)Pérez-Galán P, Dreyling M, Wiestner A. Mantle cell lymphoma: biology, pathogenesis, and the molecular basis of treatment in the genomic era. *Blood*. 2011;117:26-38.
- (36)Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. WHO Classification of Tumors of Hematopoietic and Lymphoid Tissues. 4th ed. IARC: Lyon; 2008,pp 233-237.
- (37)Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, et al. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood* 2004;103:275-82.
- (38)Klein U, Dalla-Favera R. Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. *Nat Rev Immunol* 2008;8:22-33.
- (39)Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 2000;403:503-11.
- (40)Ehinger M, Linderöth J, Christensson B et al. A subset of CD5- diffuse large B-cell lymphomas expresses nuclear cyclin D1 with aberrations at the CCND1 locus. *Am J Clin Pathol* 2008;129:630-8.
- (41)Jaffe ES, Harris NL, Vardiman JW, et al. Hematopathology. 1st ed. Saunders/Elsevier: Philadelphia; 2011,pp 97-117.
- (42)Martínez MR, Corradin A, Klein U et al. Quantitative modeling of the terminal differentiation of B cells and mechanisms of lymphomagenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109 :2672-7.

- (43)Turner CA Jr, Mack DH, Davis MM. Blimp-1, a novel zinc finger-containing protein that can drive the maturation of B lymphocytes into immunoglobulin-secreting cells. *Cell* 1994;77:297-306.
- (44)Tsuboi K, Iida S, Inagaki H et al. MUM1/IRF4 expression as a frequent event in mature lymphoid malignancies. *Leukemia* 2000;14:449-56.
- (45)Falini B, Fizzotti M, Pucciarini A, et al. A monoclonal antibody (MUM1p) detects expression of the MUM1/IRF4 protein in a subset of germinal center B cells, plasma cells, and activated T cells. *Blood* 2000;95:2084-92.
- (46)Natkunam Y, Warnke RA, Montgomery K, et al. Analysis of MUM1/IRF4 protein expression using tissue microarrays and immunohistochemistry. *Mod Pathol* 2001;14:686-94.
- (47)Alinikula J, Lassila O. Gene interaction network regulates plasma cell differentiation. *Scand J Immunol* 2011;73:512-9.
- (48)Nera KP, Kohonen P, Narvin E, et al. Loss of Pax5 promotes plasma cell differentiation. *Immunity* 2006;24:283-93.
- (49)Shaffer AL, Lin KI, Kuo TC, et al. Blimp-1 orchestrates plasma cell differentiation by extinguishing the mature B cell gene expression program. *Immunity* 2002;17:51-62.
- (50)Kallies A, Hasbold J, Fairfax K, et al. Initiation of Plasma-cell differentiation is independent of transcription factor Blimp-1. *Immunity* 2007;26:555-66.
- (51)Shaffer AL, Shapiro-Shelef M, Iwakoshi NN et al. XBP1, downstream of Blimp-1, expands the secretory apparatus and other organelles, and increases protein synthesis in plasma cell differentiation. *Immunity* 2004;21:81-93 .
- (52)Iwakoshi NN, Lee AH, Vallabhajosyula P, et al. Plasma cell differentiation and the unfolded protein response intersect at the transcription factor XBP-1. *Nat Immunol* 2003;4:321-9.
- (53)Sternberg SS. *Histology for Pathologists*. 2nd ed. Lippincott-Raven Publishers: Philadelphia-New York; 1997,pp 707-742.

- (54)Goldfinger M, Shmuel M, Benhamron S, et al. Protein synthesis in plasma cells is regulated by crosstalk between endoplasmic reticulum stress and mTOR signaling. *Eur J Immunol* 2011;41:491-502.
- (55)Oracki SA, Walker JA, Hibbs ML, et al. Plasma cell development and survival. *Immunol Rev* 2010;237:140-59.
- (56)Lefebvre V, Dumitriu B, Penzo-Méndez A et al. Control of cell fate and differentiation by Sry-related high-mobility-group box (Sox) transcription factors. *Int J Biochem Cell Biol* 2007;39:2195-214.
- (57)Dy P, Penzo-Méndez A, Wang H et al. The three SoxC proteins--Sox4, Sox11 and Sox12--exhibit overlapping expression patterns and molecular properties. *Nucleic Acids Res* 2008;36:3101-17.
- (58)Jay P, Gozé C, Marsollier C, et al. The human SOX11 gene: cloning, chromosomal assignment and tissue expression. *Genomics* 1995;29:541-5.
- (59)Penzo-Méndez AI. Critical roles for SoxC transcription factors in development and cancer. *Int J Biochem Cell Biol* 2010;42:425-8.
- (60)Vegliante MC, Palomero J, Perez- Galan P, et al. SOX11 regulates PAX5 expression and blocks terminal B-cell differentiation in aggressive mantle cell lymphoma. *Blood* 2013; 121:2175-85.
- (61)Palomero J, Vegliante MC, Rodríguez ML et al. SOX11 promotes tumor angiogenesis through transcriptional regulation of PDGFA in mantle cell lymphoma. *Blood* 2014;124:2235-47.
- (62)Fernandez V, Salamero O, Espinet B, et al. Genomic and gene expression profiling defines indolent forms of mantle cell lymphoma. *Cancer Res* 2010;70:1408-18.
- (63)Royo C, Navarro A, Clot G, et al. Non-nodal type of mantle cell lymphoma is a specific biological and clinical subgroup of the disease. *Leukemia* 2012;26:1895-8.

- (64)Kimura Y, Sato K, Imamura Y et al. Small cell variant of mantle cell lymphoma is an indolent lymphoma characterized by bone marrow involvement, splenomegaly, and a low Ki-67 index. *Cancer Sci* 2011;102:1734-41.
- (65)Nygren L, Baumgartner Wennerholm S, Klimkowska M, et al. Prognostic role of SOX11 in a population-based cohort of mantle cell lymphoma. *Blood* 2012;119:4215-23.
- (66)Ferrando AA. SOX11 is a mantle cell lymphoma oncogene. *Blood* 2013;121:2169-70.
- (67)Rodriguez-Justo M, Huang Y, Ye H, et al. Cyclin D1-positive diffuse large B-cell lymphoma. *Histopathology* 2008;52:900-3.
- (68)Teruya-Feldstein J, Gopalan A, Moskowitz CH. CD5 negative, Cyclin D1-positive diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) presenting as ruptured spleen. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2009;17:255-8.
- (69)Lucioni M, Novara F, Riboni R, et al. CD5(-) diffuse large B-cell lymphoma with peculiar cyclin D1+ phenotype. Pathologic and molecular characterization of a single case. *Hum Pathol* 2011;42:1204-8.
- (70)Ok CY, Xu-Monette ZY, Tzankov A et al. Prevalence and clinical implications of cyclin D1 expression in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) treated with immunochemotherapy: a report from the International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program. *Cancer* 2014;120:1818-29.
- (71)Perry AM, Cardesa-Salzman TM, Meyer PN et al. A new biologic prognostic model based on immunohistochemistry predicts survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2012;120:2290-6.
- (72)Soldini D, Valera A, Sole C, et al. Assessment of SOX11 Expression in Routine Lymphoma Tissue Sections, characterization of New Monoclonal Antibodies for diagnosis of Mantle Cell Lymphoma. *Am J Surg Pathol* 2014;38:86-93.

(73)Jaffe ES, Harris NL, Vardiman JW, et al. Hematopathology. 1st ed. Saunders/Elsevier: Philadelphia; 2011,pp 333-348.

(74)Gradowski JF, Jaffe ES, Warnke RA, et al. Follicular lymphomas with plasmacytic differentiation include two subtypes. Mod Pathol 2010;23:71-9.

(75)Cooper CL, Joshua DE, Lee CS, et al. Extranodal plasmablastic lymphoma arising in mantle cell lymphoma. Histopathology 2007;51:856-9.

(76) Ondrejka SL, Lai R, Smith SD, et al. Indolent mantle cell leukemia: a clinicopathological variant characterized by isolated lymphocytosis, interstitial bone marrow involvement, kappa light chain restriction, and good prognosis. Haematologica 2011;96:1121-7.

(77) Espinet B, Ferrer A, Bellosillo B, et al. Distinction between asymptomatic monoclonal B-cell lymphocytosis with cyclin D1 overexpression and mantle cell lymphoma: from molecular profiling to flow cytometry. Clin Cancer Res 2014;20:1007-19.

(78)Meggendorfer M, Kern W, Haferlach C et al. SOX11 overexpression is a specific marker for mantle cell lymphoma and correlates with t(11;14) translocation, CCND1 expression and an adverse prognosis. Leukemia 2013;27:2388-91.

(79)Nodit L, Bahler DW, Jacobs SA et al. Indolent mantle cell lymphoma with nodal involvement and mutated immunoglobulin heavy chain genes. Hum Pathol 2003;34:1030-4.

(80)Hernandez L, Fest T, Cazorla M, et al. p53 gene mutations and protein overexpression are associated with aggressive variants of mantle cell lymphomas. Blood 1996;87:3351-9.

(81)Greiner TC, Dasgupta C, Ho VV, et al. Mutation and genomic deletion status of ataxia telangiectasia mutated (ATM) and p53 confer specific gene expression profiles in mantle cell lymphoma. Proc Natl Acad Sci U S A 2006;103:2352-7.

(82)Jaffe ES, Harris NL, Vardiman JW, et al. Hematopathology. 1st ed. Saunders/Elsevier: Philadelphia; 2011,pp 319-332.

(83)Perez-Galan P, Mora-Jensen H, Weniger MA et al. Bortezomib resistance in mantle cell lymphoma is associated with plasmacytic differentiation. Blood 2011;117:542-52.

