



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS ALTERACIONES  
ESTRUCTURALES Y NUMÉRICAS DEL GEN *BCL6* EN  
LINFOMAS FOLICULAR Y DIFUSO DE CÉLULAS GRANDES  
TIPO B POR MEDIO DE LA TÉCNICA DE HIBRIDACIÓN IN  
SITU CON FLUORESCENCIA (FISH)**

**T E S I S**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA  
PRESENTA: YEVGENIYA SVYRYD**

**Tutor: DR. OSVALDO M. MUTCHINICK B.**



Mexico, D.F.

2006



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado asignado:

**PROFESORES**

Presidente **MARISOL LOPEZ LOPEZ**

Vocal **ALICIA CERVANTES PEREDO**

Secretario **OSVALDO M. MUTCHINICK**

1<sup>er</sup> Suplente **EVA DELIA CALDERON GARCIDUEÑAS**

2<sup>o</sup> Suplente **PERLA DEYANIRA MALDONADO JIMÉNEZ**

El tema se desarrolló en:

**INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICION SALVADOR**

**ZUBIRAN**

**DEPARTAMENTO DE GENETICA**

Asesor del tema: **Dr. OSVALDO M. MUTCHINICK**

Supervisor técnico: **QFB. Renata Rivera**

Sustentante: **Yevgeniya Svyryd**



Three handwritten signatures are present on the right side of the page, each written over a horizontal line. The top signature is the most prominent and appears to be 'O. Mutchinick'. The middle signature is less legible but appears to be 'Renata Rivera'. The bottom signature is also less legible but appears to be 'Yevgeniya Svyryd'.

## INDICE

<b>I.</b>	<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>2</b>
	<b>a. Generalidades.....</b>	<b>2</b>
	<b>b. Enfermedad de Hodgkin.....</b>	<b>3</b>
	<b>c. Linfomas no Hodgkin.....</b>	<b>4</b>
	<b>d. Linfoma folicular.....</b>	<b>7</b>
	<b>e. Linfoma difuso de células grandes, inmunofenotipo B.....</b>	<b>12</b>
	<b>f. Características de los rearrreglos del <i>BCL-6</i>. ....</b>	<b>17</b>
	<b>g. Actividad biológica de la proteína BCL-6.....</b>	<b>20</b>
<b>II.</b>	<b>HIPÓTESIS.....</b>	<b>21</b>
<b>III.</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>22</b>
<b>IV.</b>	<b>METODOLOGÍA Y TÉCNICAS.....</b>	<b>23</b>
<b>V.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>31</b>
<b>VI.</b>	<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>38</b>
<b>VII.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>44</b>
<b>VIII.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>45</b>
<b>IX.</b>	<b>ANEXO .....</b>	<b>55</b>

## I. INTRODUCCIÓN

### **Generalidades.**

Los linfomas se definen como un grupo heterogéneo de neoplasias malignas caracterizadas por la proliferación celular en los tejidos linfoides. Estas transformaciones malignas se originan usualmente en los nódulos linfáticos, aunque también se pueden iniciar en otras partes de cuerpo (Foon y Fisher, 2001). Los linfomas son lesiones tumorales compuestas principalmente de linfocitos. Existen diversos tipos y subtipos que varían de acuerdo a su composición celular, morfología, sitio de presentación, curso clínico y características genéticas. La distinción y clasificación de linfomas, reconocidos por primera vez por Thomas Hodgkin en 1832 (Hodgkin, 1832), ha evolucionado desde entonces y ha sido objeto de diversas discusiones a lo largo de las últimas décadas. Inicialmente se definieron dos grupos haciendo la distinción entre la enfermedad de Hodgkin y otras condiciones tanto malignas como no malignas (Sternberg, 1898; Reed, 1902). Los trabajos más actuales acerca de este tema son “*A Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasm*” (Harris *et al*, 1994) y su reciente modificación por la OMS “*Classification of Neoplastic Diseases of the Hematopoietic and Lymphoid Tissues*” (Jaffe *et al*, 1999). En estos documentos las entidades patológicas se definen por una combinación de morfología, inmunofenotipo, hallazgos genéticos y características clínicas. Hasta el momento se han descrito 4 subtipos en el grupo de enfermedad de Hodgkin (EH) y más de 20 subtipos en linfomas no-Hodgkin (LNH), de acuerdo a la clasificación REAL/OMS.

## Enfermedad de Hodgkin

La EH se caracteriza por la presencia de células morfológicamente únicas y propias de este tipo de linfoma, células gigantes multinucleadas denominadas células de Hodgkin y Reed-Sternberg (H-RS). Estas células malignas están rodeadas por células hematopoiéticas reactivas que crean un microambiente con una red de interacciones bidireccionales. La proporción de células reactivas en el tejido afectado varía dependiendo del subtipo de EH. Las células H-RS derivan de los linfocitos B maduros, lo cual se pudo establecer sólo después de evaluar los rearrreglos cromosómicos en la región variable de los genes de inmunoglobulinas (Küppers *et al*, 1994; Kanzler *et al*, 1996). Tales rearrreglos ocurren únicamente en los linfocitos B que pasaron por el proceso de hipermutaciones somáticas (Marafioti *et al*, 2000). A pesar de su origen, el patrón de expresión que presentan las células H-RS es inusual, contiene marcadores de diferentes tipos celulares, como granulocitos y monocitos (CD15), linfocitos B (Pax-5), células plasmáticas (MUM-1, CD138) y linfocitos activados (CD30) (Pileri *et al*, 2002a; Küppers, 2002). Los estudios citogenéticos de estas células revelan alteraciones cromosómicas numéricas en la gran mayoría de los casos (Weber-Matthiesen *et al*, 1995). Las translocaciones, en cambio, son excepcionales en las células H-RS a diferencia de otras células tumorales. Los rearrreglos característicos para otros tipos de linfomas que involucran los proto-oncogenes *BCL6* (*B-cell lymphoma 6*), *BCL2* (*B-cell lymphoma 2*), *MYC* (*v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)*) o *MALT1* (*mucosa associated lymphoid tissue lymphoma translocation gene 1*) se detectan en pocas ocasiones en EH clásica (Gravel *et al*, 1998; Martin-Subero *et al*, 2004). Sin embargo, en el subtipo de EH de predominancia linfocítica los rearrreglos del gen *BCL-6* son más frecuentes y han sido detectados utilizando la técnica de citogenética molecular de hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) (Franke *et al*, 2001; Wlodarska *et al*, 2003). Aunque no está claro el papel de los rearrreglos del *BCL-6* en la patogénesis de la enfermedad, ciertamente indican un mecanismo diferente para esta entidad específica de EH.

## **Linfomas no-Hodgkin.**

Todas las formas restantes de linfomas que no entran en definición de EH, se agrupan bajo el denominador común de linfomas no-Hodgkin (LNH). Se conocen como un conjunto de neoplasias en las que la célula de origen es un linfocito y su localización está fuera de la médula ósea. Los LNH son un grupo heterogéneo de enfermedades que presentan características morfológicas, inmunofenotípicas, genéticas y moleculares que les confieren diferente comportamiento biológico y clínico diferente. En el 85 % de los casos los LNH derivan de linfocitos B maduros y el resto de linfocitos T. La clasificación REAL/OMS separa estos dos grandes grupos de acuerdo al origen celular, y entre ambos se describen 20 diferentes tipos de LNH (Chan, 2001). La mayoría de estos tumores, 70-80 %, tiene su origen en ganglios linfáticos, el resto son extranodales. De todos los LNH, las entidades que se presentan con mayor frecuencia en la población mundial son el *linfoma folicular* (LF) y el *linfoma difuso de células grandes con inmunofenotipo B* (LDCGB). De acuerdo a los estudios epidemiológicos en la población adulta, el LF se diagnostica en 40% de los casos, mientras que el LDCGB en 30%. (Harris *et al*, 1994).

Los LNH se consideran un cáncer relativamente común con consecuencias graves para el paciente. La enfermedad afecta preferentemente a los adultos, el mayor número de casos nuevos se ha detectado en la séptima década de la vida. En Estados Unidos hay 3500 individuos nuevos afectados por año, lo cual constituye el 4% de todos los cánceres diagnosticados *de novo* (Grulich y Vajdic, 2005).

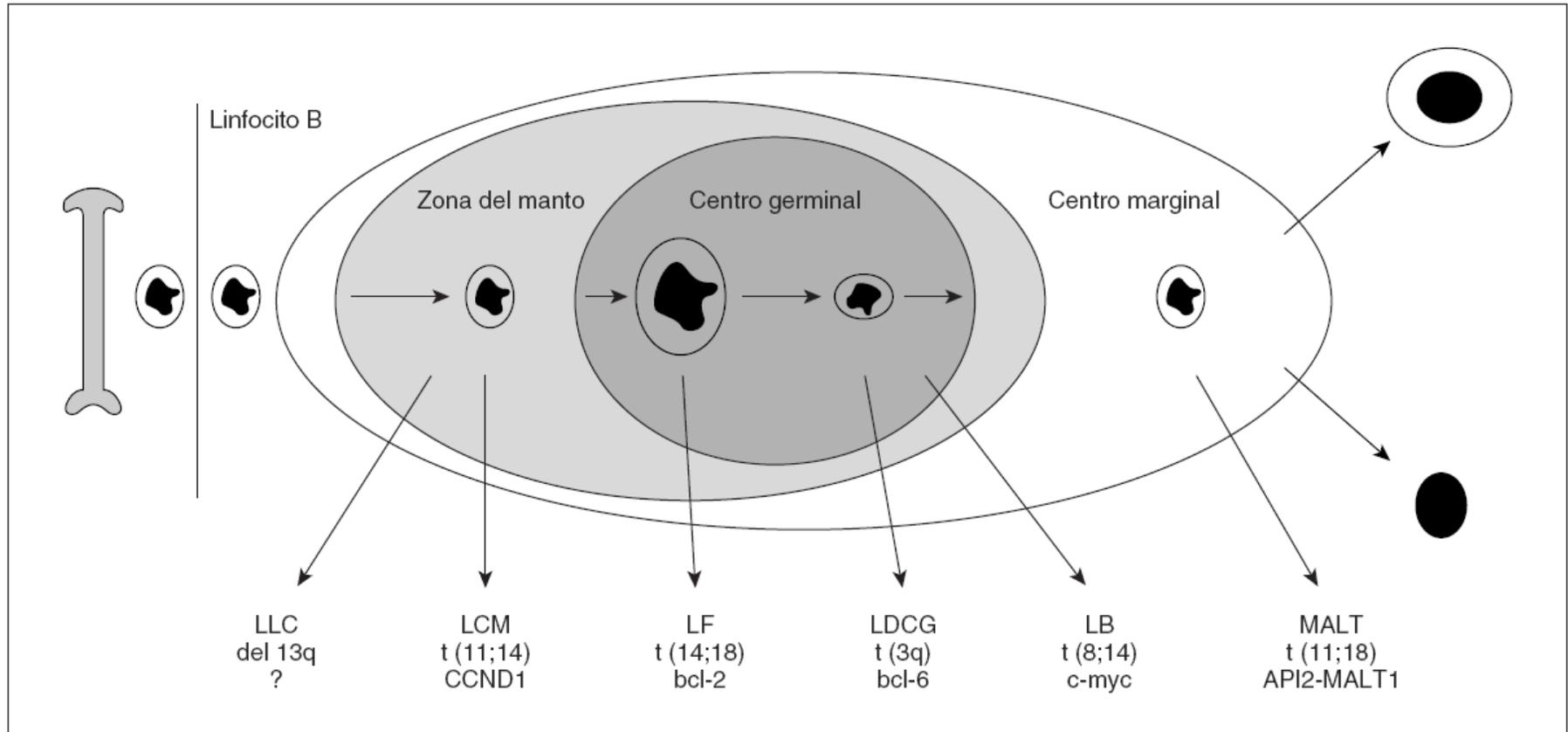
Los LNH son más comunes en hombres que en mujeres, con relación de 1.4:1.0. En las últimas décadas la incidencia de LNH ha aumentado progresivamente a nivel mundial en todos los grupos de edad tanto en hombres como en mujeres. Para el año 2001, la incidencia fue de 16.1 por cada 100,000 hombres y 11.3 por cada 100,000 mujeres (AIHW, 2001).

Existe una marcada variación étnica, siendo los LNH menos frecuentes en países de Asia y África, relativamente frecuentes en países de Europa y muy frecuentes en América del Norte y Australia (Parkin *et al*, 2003). En Estados Unidos la incidencia es mayor en la población blanca que en la negra, sin embargo, al parecer un nivel socio-económico más alto tiene más importancia que las características étnicas (Scherr y Mueller, 1996).

Existen factores que pueden predisponer a LNH, entre éstos destacan las deficiencias del sistema inmune. Dichas alteraciones incluyen inmunosupresión post-trasplante (Penn, 1995) e infección por virus de inmunodeficiencia humano (VIH) (Grulich *et al*, 1999). Por otro lado, existe un número de organismos infecciosos que se han relacionado con LNH y que se cree pudieran inducir el riesgo de desarrollar el tumor. Los agentes infecciosos más comúnmente asociados son el virus de Epstein-Barr (Mueller, 1999), *Helicobacter pylori* sobre todo en LNH gástricos (De Sanjose *et al*, 2004) y virus T-linfotrópico humano tipo I (Manns *et al*, 1993), entre otros. A cada una de las categorías de LNH reconocidas en la actualidad se ha tratado de relacionarla con un estado particular de la diferenciación del linfocito en el ganglio linfático (Alizadeh *et al*, 2000). Así, se han definido linfomas cuyo origen radica en la zona del manto, otros con el inicio del desarrollo en el centro germinal o provenientes de la zona marginal del folículo ganglionar.

Las alteraciones genéticas primarias más frecuentes en LNH son las translocaciones cromosómicas que dan lugar a la desregulación de genes con un potencial oncogénico. La mayoría de tales rearrreglos podría ser un importante mecanismo en la patogénesis de muchos de estos tumores. Se han identificado algunas alteraciones relativamente específicas en diferentes tipos de linfomas (figura 1), lo cual es de gran utilidad en el diagnóstico de la enfermedad (Colomer *et al*, 2003).

Figura 1: Alteraciones citogenéticas más representativas en linfomas no-Hodgkin de acuerdo al estado de diferenciación del linfocito B.



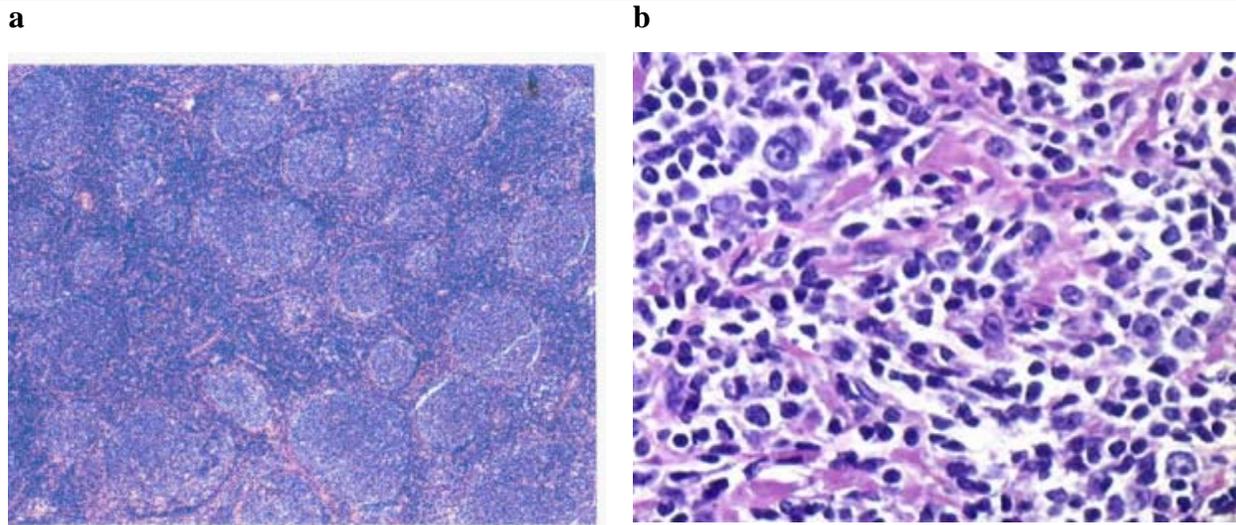
LLC – linfoma linfoplasmacitoide; LCM – linfoma de células del manto; LF – linfoma folicular; LDCG – linfoma difuso de células grandes; LB – linfoma de Burkitt; MALT – linfoma de linfocitos B de la zona marginal. (Modificado de Colomer *et al*, 2003)

## **Linfoma folicular (LF).**

Se define como un tumor compuesto por células del centro folicular del nódulo linfático, que consiste en una mezcla de centrocitos (células hendidas) y centroblastos (grandes células no hendidas) (Lukes y Collins, 1974; Harris *et al*, 1994). La enfermedad se desarrolla en los linfocitos B derivados del centro germinal del folículo nodular (Harris *et al*, 1994). Las características comunes de esta enfermedad son su curso clínico relativamente indolente y larga supervivencia de los pacientes; sin embargo, es un padecimiento maligno incurable. La incidencia de la enfermedad parece estar influenciada por la edad, historia de tabaquismo, sexo masculino y la exposición a pesticidas (Liu *et al*, 1994; Bell *et al*, 1995; Fuscoe *et al*, 1998).

La principal característica morfológica del LF es la presencia de *folículos*, estructuras dentro del ganglio linfático de forma ovalada donde se lleva a cabo la diferenciación y maduración de linfocitos. Estos folículos se presentan en el tejido normal, también pueden conservar su morfología en algunas condiciones malignas, sin embargo la alteración de su estructura discreta indica un proceso neoplásico. Uno de los elementos indispensables en el diagnóstico y la clasificación de LF es la conservación de la morfología de los folículos. Los folículos visualizados en un corte histológico de tejido ganglionar con aplicación de tinción de eosina-hematoxilina resaltan por la menor intensidad del colorante y un patrón celular característico (figura 2a). En algunas ocasiones se pueden encontrar áreas difusas, donde se pierde la estructura folicular. Este cambio morfológico podría indicar un pronóstico más desfavorable del LF. En la clasificación de la OMS se reconoce tres grados de LF de acuerdo a la composición celular del tejido afectado (tabla 1) (Jaffe *et al*, 1998). La imagen característica del LF Grado I incluye linfocitos pequeños y algunas células grandes (figura 2b) cuya proporción aumenta con el grado de enfermedad.

Figura 2. Características morfológicas de Linfoma folicular.



Cortes histológicos con tinción de eosina y hematoxilina: a) un campo del tejido ganglionar con aumento de baja resolución donde se pueden observar zonas de menor densidad denominadas folículos; b) un acercamiento de mayor resolución muestra células pequeñas y algunas células grandes. Modificado de Harris *et al*, 1994.

Tabla 1. Grados histológicos de LF

GRADO	CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS
I	Pequeñas células hendidas y células grandes < 25%
II	Pequeñas células hendidas y células grandes 25% - 50%
IIIA	Pequeñas células hendidas y células grandes >50%
IIIB	Células grandes y áreas difusas

Modificado de Jaffe *et al*, 1998.

### *Hallazgos genéticos:*

El LF fue uno de los primeros linfomas en los que se encontró un defecto molecular característico. La translocación (14;18) en LF fue reconocida al inicio de los años ochentas cuando varios grupos de investigación realizaron la clonación de los puntos de ruptura en los cromosomas involucrados (Tsujimoto *et al*, 1984; Bakshi *et al*, 1985; Clearly y Sklar, 1985). Dichos estudios llevaron a la definición del rearrreglo del gen anti-apoptótico *BCL-2* localizado en el cromosoma 18q21. Este gen se encuentra activo a nivel transcripcional en el tejido linfoide normal, pero está apagado en los centros germinales de nódulos linfáticos sanos. Sin embargo, la expresión anormal de la proteína *BCL-2*, que se localiza en la membrana mitocondrial interna funciona como una proteína antiapoptótica, protege a las células de una muerte programada y permite la acumulación de centrocitos longevos (Tsujimoto *et al*, 1985; McDonnell *et al*, 1989; Hockenbery *et al*, 1990 y 1991).

La translocación clásica que involucra el *BCL-2* es la t(14;18)(q32;q21). Se ha detectado por técnicas de citogenética convencional en 80-90% de los tumores reportados (Yunis *et al*, 1987). Como resultado de esta translocación ocurre la yuxtaposición del gen *BCL-2* con el gen *IGH* en 14q32, lo cual resulta en una sobre-expresión de la proteína *BCL-2* estructuralmente intacta. Si bien es una translocación típica de LF, también ha sido identificada en una proporción significativa de individuos sanos (Aster *et al*, 1992). En ausencia de la enfermedad el significado de la translocación es incierto, pero podría sugerir que es un evento temprano de iniciación donde se requieren subsecuentes alteraciones oncogénicas acumulativas para la manifestación de LF. Es importante señalar, que independientemente de su función anti-apoptótica, la proteína *BCL-2* también puede promover el arresto del ciclo celular (Linette *et al*, 1996) lo cual podría explicar en parte el curso indolente de LF.

Se han realizado estudios con respecto a la proporción de la t(14;18)(q32;q21) en diferentes grados de LF y se ha visto que no son homogéneos a nivel molecular. Así, los

linfomas grado I/II presentan la translocación en 88% de los casos, grado IIIA en 64% y grado IIIB menos de 1%, por lo cual algunos investigadores recomiendan separar el LF grado IIIB como una entidad aparte debido a sus diferencias a nivel molecular (Katzenberger *et al*, 2004).

Si bien la t(14;18) es la alteración cromosómica más común, no es específica de LF y tampoco es la única. La t(14;18)(q32;q21) ha sido detectada en 20-30% de los casos de LDCGB, por lo cual se piensa que estos tumores se podrían originar de células del centro folicular (Jacobson *et al*, 1993). Por otro lado, en la mayoría de los LF se ha demostrado al menos otra anormalidad adicional en el cariotipo (De Jong, 2005). Aunque no hay una evidencia directa de que estos eventos moleculares adicionales a la t(14;18) resulten en un linfoma clínicamente evidente, la observación de la acumulación de múltiples lesiones génicas que afectan protooncogenes durante la progresión de LF lleva a pensar en un mecanismo similar.

Aproximadamente en un 10% de los casos de LF la proteína BCL-2 no puede ser detectada mediante inmunohistoquímica, indicando la posibilidad de un mecanismo alternativo de escape a la apoptosis. El protooncogén *BCL-6* en 3q27 ha sido involucrado en 5-15% de los rearrreglos cromosómicos en LF (Skinnider *et al*, 1999; Jaffe *et al*, 2001). El papel de la activación del *BCL-6* como una señal alternativa de la supervivencia de la célula se ha discutido por varios grupos de investigación con argumentos tanto a favor (Lopez-Guillermo *et al*, 1999; Akasaka *et al*, 2003), como en contra (Jardín *et al*, 2002) de esta hipótesis. Tampoco hay evidencia del valor pronóstico de los rearrreglos del *BCL-6* en LF (Tilly *et al*, 1994; Bastard *et al*, 1994).

### *Inmunofenotipo.*

Las células tumorales de LF expresan las inmunoglobulinas de superficie (IgM>IgD>IgG>IgA), los marcadores de linaje de linfocitos B (CD20, CD79a, Pax-5) y el marcador del centro germinal (CD10 +/-), pero no el marcador de linfocitos T (CD5). Es notable la expresión de la proteína BCL-2, que es característica en linfomas foliculares y que se presenta en la gran mayoría de los casos, de tal manera que permite distinguir los folículos reactivos de los neoplásicos. La determinación del patrón de expresión de BCL-2 es una de las principales herramientas para la definición del diagnóstico de LF.

### *Transformación de LF en LDCGB*

En algunos casos los pacientes con LF pueden sufrir la transformación morfológica a un linfoma más agresivo como el LDCGB. Usualmente estos eventos de transformación se asocian con el progreso rápido de la enfermedad, resistencia al tratamiento, empeoramiento del pronóstico y corta supervivencia de los pacientes (Hubbard *et al.*, 1982). Algunos trabajos reportan la frecuencia de transformación en 25-60% de los pacientes (Acker *et al.*, 1983; Horning *et al.*, 1984). Existe evidencia de que la transformación histológica de LF podría estar asociada con la acumulación de mutaciones en la región 5' reguladora no codificante del oncogén *BCL-6* (Lossos y Levy, 2000) y que el subgrupo de LF con rearrreglos del *BCL-6* podría ser más propenso a eventos tempranos de transformación (Akasaka *et al.*, 2003). De tal manera que la detección temprana de alteraciones en *BCL-6* podría ayudar en la elección del tratamiento más adecuado y prevención de la transformación.

## **Linfoma difuso de células grandes inmunofenotipo B.**

El linfoma difuso de células grandes inmunofenotipo B (LDCGB) se define como un linfoma compuesto por células grandes con núcleos vesiculares, un nucleolo prominente y alto índice de proliferación (Harris *et al*, 1994). La incidencia de esta enfermedad se ha estimado en más de 25,000 casos al año en Estados Unidos (Jaffe *et al*, 1997).

El LDCGB se considera un grupo heterogéneo de tumores que varía en su contenido celular, fenotipo, citogenética, características moleculares, sitios de presentación e historia natural de enfermedad (Barrans *et al*, 2002). Este proceso neoplásico se puede desarrollar *de novo* o derivar de un linfoma indolente previo, como linfoma de zona marginal o linfoma folicular. A pesar de que el LDCGB se describe como una sola entidad en la clasificación de la OMS, se reconocen actualmente diversas variantes morfológicas y fenotípicas. Se ha visto que el curso clínico del LDCGB es muy variables entre los pacientes, la mayoría tiene una respuesta inicial positiva a la quimioterapia, sin embargo menos de la mitad logran mantenerse en remisión prolongada (The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project, 1997; Vose, 1998).

Estas variaciones se han atribuido tentativamente a las diferencias en la expresión génica de las células tumorales. De manera normal el linfocito B atraviesa varias etapas de maduración y diferenciación en el folículo del ganglio linfático. La mayoría de estos eventos ocurren en el centro germinal (CG), la estructura principal del folículo que se compone de células blásticas pequeñas, centroblastos, centrocitos y ocasionalmente de células plasmáticas. Las diferentes etapas de diferenciación del linfocito B incluyen el estado pre-CG, CG en si y post-CG. En cada etapa específica la expresión de diferentes marcadores celulares cambia. De tal manera que los linfocitos vírgenes que entran al CG expresan proteínas CD10 y BCL-6, mientras que las células post-CG además expresan MUM1-IRF4, VS38c y CD138 (Colomer *et al*, 2003).

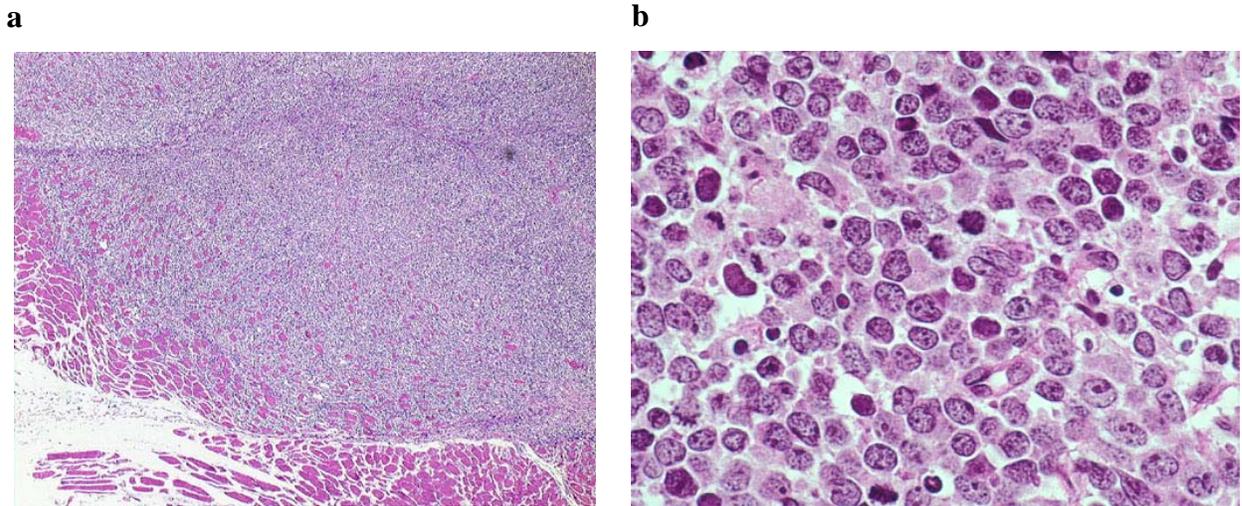
De acuerdo al patrón de expresión del ARNm determinado mediante las técnicas de microarreglos de ADNc, el LDCGB se puede subdividir en tres subtipos que influyen el

pronóstico de la enfermedad. En el primer subtipo las células tienen un patrón de expresión similar a los linfocitos B del centro germinal (BCG); en el segundo, el patrón de expresión se asimila más a los linfocitos B activados (LBA) y el tercer subtipo es heterogéneo y no tiene una definición bien establecida (Alizadeh *et al*, 2000; Filipits *et al*, 2002). Se ha reportado que el subtipo BCG se relaciona con una mejor respuesta inicial al tratamiento y mayor sobrevida, sin embargo después de 5 años estas diferencias con el subtipo LBA desaparecen (Poulsen *et al*, 2005).

Morfológicamente el LDCGB presenta un patrón de crecimiento celular difuso, a diferencia de LF, prácticamente no se observan las estructuras foliculares en los nódulos linfáticos (figura 3a). En la mayoría de los casos se puede observar una cantidad aumentada de células en mitosis. Un examen de mayor acercamiento muestra que este linfoma consiste de células grandes caracterizadas por un pronunciado pleomorfismo nuclear, prominentes nucleolos y un citoplasma basófilo (figura 3b). En un 20-25% de los casos un tipo celular puede predominar sobre los otros, formando diferentes variantes morfológicas de LDCGB (Tabla 2).

El LDCGB se desarrolla a partir de los linfocitos B normales a diferentes etapas de diferenciación. La patogénesis del LDCGB representa un proceso de varios pasos que involucra la acumulación de múltiples lesiones genéticas que llevan finalmente a la selección de una clona celular maligna.

Figura 3. **Características morfológicas de Linfoma Difuso de Células Grandes (B).**



Cortes histológicos con tinción de eosina y hematoxilina: a) un campo de tejido ganglionar con difusión de células, se pierden las estructuras foliculares; b) la población celular consiste predominantemente de células grandes con núcleos pleomórficos. Modificado de Harris *et al*, 1994.

Tabla 2. **Variantes morfológicas de LDCGB**

---

Centroblástico
Inmunoblástico (con o sin diferenciación de células plasmáticas)
Anaplásico
Plasmablástico
Multilobulado
Linfoma de células B rico en células T / histiocitos

---

Modificado de Pileri *et al*, 2002b.

### *Immunofenotipo:*

Las células del LDCGB expresan marcadores del linaje de linfocitos B (CD19,20,22,79a) de manera similar al tejido linfoide sano. Los LDCGB nodulares se pueden subdividir en tres grupos (tabla 3) de acuerdo al perfil de expresión de los marcadores moleculares en el tejido tumoral (Zinzani *et al*, 2005).

Tabla 3. **Immunofenotípos de LDCGB**

	CD10	CD30	CD138	Bcl-2	Bcl-6	IRF4	Origen de derivación
Grupo 1	+	-	-	-	+	+/-	BCG
Grupo 2	-	+/-	-/+	+	-	-/+	LBA
Grupo 3	+/-/-	-	-	+	+	-/+/-	Probablemente BCG o post-CG

BCG = linfocitos B del centro germinal; LBA =linfocitos B activados. Modificado de Zinzani *et al*, 2005.

### *Hallazgos genéticos:*

Molecularmente los LDCGB no son homogéneos, existe una amplia variedad de alteraciones cromosómicas determinadas mediante el análisis de citogenética convencional, que incluyen tanto alteraciones numéricas como estructurales (tabla 4). No se ha definido una anomalía característica de este grupo de linfomas; sin embargo, se han descrito los mecanismos moleculares que influyen la aparición de mutaciones en el ADN de linfocitos B (Offit *et al*, 1991).

Los rearrreglos que involucran la región 3q27 son anomalías comunes en los LDCGB y se detectan en un 15-30% de los casos (Dalla-Favera *et al*, 1994; Bulter *et al*, 1997; Vitolo *et al*, 1998). En la mayoría de los estudios genéticos de los LDCGB no se hace la separación de acuerdo al origen de linfoma, tal vez por eso el porcentaje de rearrreglos del *BCL6* es tan variable. Katzenberger *et al* (2004) en su estudio analizaron los LDCGB de origen nodular y de origen extranodular por separado y encontraron que las alteraciones en el *locus* del

gen *BCL6* se dan en 25% de los linfomas nodulares y sólo en 7% de los linfomas extranodulares.

Tabla 4. Rearreglos cromosómicos en los LDCGB

TRANSLOCACIÓN	GENES INVOLUCRADOS
t(1;7)(q21;q22)	?
t(1;13)(p32;q14)	?
t(1;14)(q21;q32)	<i>MUC1</i> y <i>IGH</i>
t(1;22)(q22;q11)	<i>FCGRIIB</i> y <i>IGL</i>
t(3;2)(p27;p12)	<i>BCL-6</i> y <i>IGK</i>
t(3;3)(p27;q29)	<i>BCL-6</i> y <i>TFRC</i>
t(3;4)(q27;p13)	<i>BCL-6</i> y <i>RHOH/TTF</i>
t(3;6)(p27;p12)	<i>BCL-6</i> y <i>HSP90B</i>
t(3;6)(p27;p21.3)	<i>BCL-6</i> y <i>HIST1H1A</i>
t(3;6)(p27;p21.2)	<i>BCL-6</i> y <i>PIMI</i>
t(3;6)(p27;p21)	<i>BCL-6</i> y <i>SFRS3</i>
t(3;7)(p27;p12)	<i>BCL-6</i> y <i>ZNFN1A1</i>
t(3;11)(p27;q23.1)	<i>BCL-6</i> y <i>BOB/OBF1</i>
t(3;12)(p27;12q23-24.1)	<i>BCL-6</i> y <i>GADPH</i>
t(3;13)(q27;q14)	<i>BCL-6</i> y <i>LCP1</i>
t(3;14)(p27;q32)	<i>BCL-6</i> y <i>HSP89A</i>
t(3;14)(p27;q32)	<i>BCL-6</i> y <i>IGH</i>
t(3;16)(p27;p11)	<i>BCL-6</i> y <i>IL21R</i>
t(3;16)(p27;p13)	<i>BCL-6</i> y <i>MHCIITA</i>
t(3;18)(p27;p11.2)	<i>BCL-6</i> y <i>EIF4AII</i>
t(3;22)(p27;q11)	<i>BCL-6</i> y <i>IGL</i>
t(5;16)(?;q11-q12)	?
der(6)t(6;8)(q11;q11)	?
t(10;14)(q24;q32)	<i>NFKB2</i> y <i>IGH</i>
t(14;15)(q32;q11-13)	<i>IGH</i> y <i>BCL8</i>
t(14;18)(q32;q21)	<i>IGH</i> y <i>BCL2</i>
t(19;22)(q13;q11-q13)	?

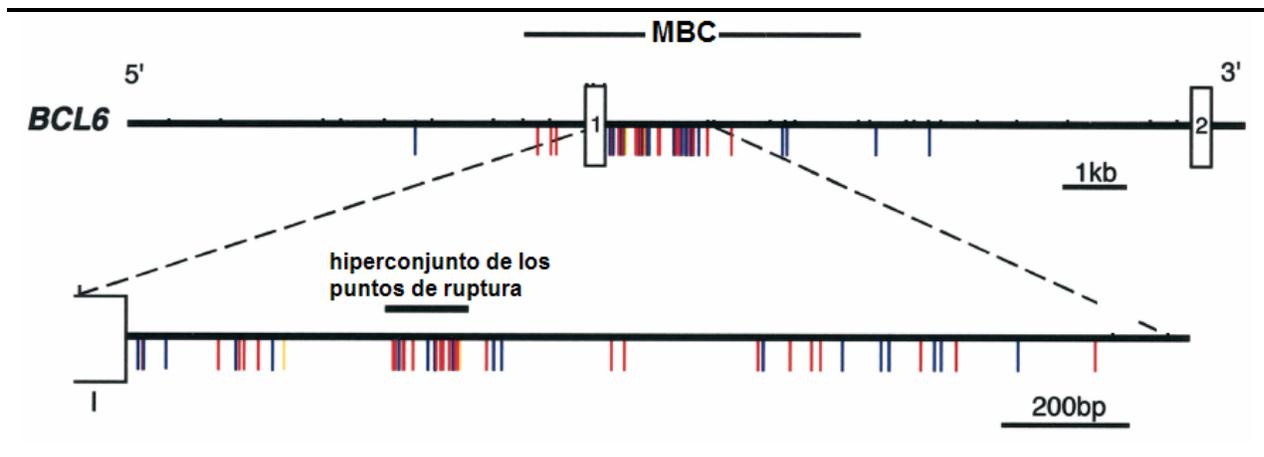
Modificado de Xu *et al*, 2000 ; Vega y Medeiros, 2003

## Características de los rearrreglos del *BCL-6*.

Las translocaciones que involucran la región 3q27 han sido identificadas en 1 de cada 6 linfomas malignos, principalmente en LNH de linfocitos B y han sido asociados a variantes agresivas como el LDCGB (Bastard *et al*, 1994; Lo *et al*, 1994). Debido al interés en aclarar posibles mecanismos fisiopatológicos de las neoplasias en cuestión, se buscaron genes candidatos en 3q27. Varios autores coincidieron en la identificación del proto-oncogen actualmente denominado *B-cell lymphoma 6 (BCL-6)*<sup>1</sup> (Offit *et al*, 1989; Bastard *et al*, 1992; Ye *et al*, 1993; Baron, *et al*, 1993; Kerchaert *et al*, 1993).

La mayoría de las rupturas identificadas en *BCL-6* ocurren dentro de la región reguladora altamente conservada de 4.0 kb llamada el sitio principal de puntos de rupturas (MBC)<sup>2</sup> (Bastard *et al*, 1994). Esta región abarca el promotor, el primer exón no codificante y la región 5' del primer intrón del gen (figura 4), siendo esta última unidad la más afectada por las rupturas.

Figura 4. Distribución de los puntos de translocación del *BCL-6*.



Modificado de Akasaka *et al*, 2000.

<sup>1</sup> También conocido como *BCL5*, *BCL6A*, *LAZ3*, *ZBTB27*, *ZNF51*

<sup>2</sup> Major Breakpoint Cluster (MBC)

Los genes compañeros de la translocación del *BCL-6* comúnmente son genes de inmunoglobulinas localizados en las bandas cromosómicas 2p12, 14q32 y 22q11. Sin embargo hay una variedad de otros cromosomas que también se pueden combinar en las translocaciones con el cromosoma 3, un fenómeno llamado “translocaciones promiscuas” (Akasaka *et al*, 2000; Lossos *et al*, 2000). Como resultado de este fenómeno, el gen *BCL-6* se fusiona con más de 15 genes diferentes (tabla 4) (Xu *et al*, 2000).

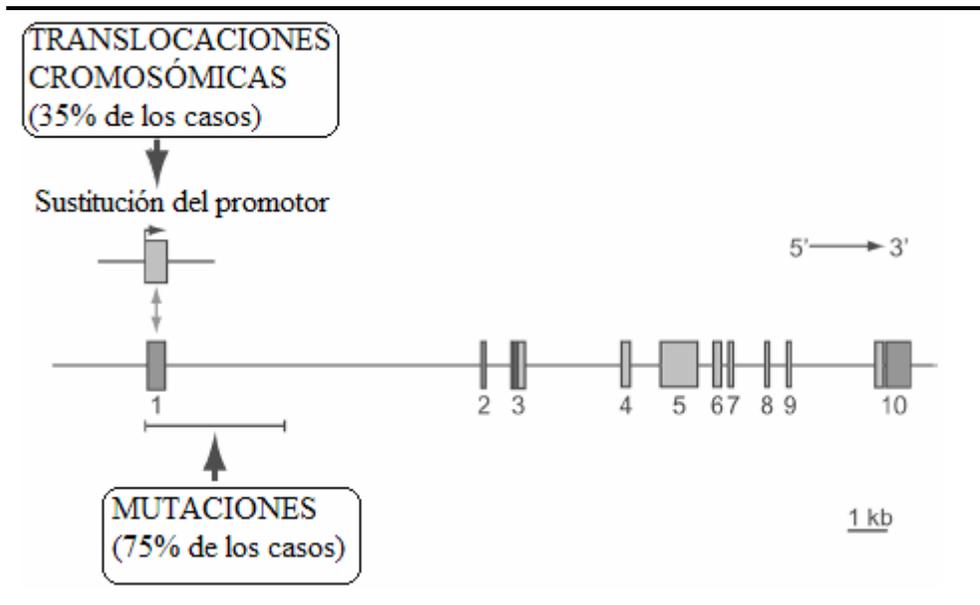
La región reguladora que contiene al promotor del *BCL-6* es removida o alterada por las translocaciones. Así, los exones 2-10 del *BCL-6* son yuxtapuestos río abajo del gen con el que se fusiona y que tiene su propia región reguladora (Ye *et al*, 1995; Chen *et al*, 1998). Como resultado de este mecanismo denominado “sustitución del promotor”, los promotores heterólogos llevan a la expresión desregulada de los exones codificantes intactos del *BCL-6*. De tal manera que, a diferencia de otro tipo de translocaciones en las que la fusión de dos genes resulta en la formación de una proteína truncada, en este caso se obtiene una proteína totalmente normal, pero que se expresa de manera descontrolada a falta de región reguladora propia.

Como ya se ha mencionado, el mayor número de alteraciones del gen *BCL-6* se presenta en el LDCGB. A nivel cromosómico se observan translocaciones recíprocas en el 35% de los casos, encontrándose además mutaciones en un 75% (figura 5). La distribución de los sitios de ruptura se sobrepone a la región que es afectada por las mutaciones somáticas, sugiriendo un mecanismo común para ambas aberraciones (Akasaka *et al*, 2000).

La fuente de estas mutaciones es un proceso natural llamado “hipermutaciones somáticas” (HS). Se lleva a cabo en linfocitos B durante las reacciones del centro germinal y su principal finalidad es generar la diversidad de anticuerpos por medio de la introducción de rearrreglos en los genes de IgV. La tasa de mutaciones durante este proceso es muy alta, aproximadamente de  $10^{-3}$ - $10^{-4}$ /pb/generación (Pasqualucci *et al*, 2003a). Sin embargo se ha

demostrado que los genes *IGV* no son el único blanco de HS. El gen *BCL-6* también es afectado por este proceso, aunque con una tasa mutacional 50 veces menor (Pasqualucci *et al*, 1998; Shen *et al*, 1998).

Figura 5. **Translocaciones cromosómicas y mutaciones somáticas en la región 5' no codificante del *BCL-6* en el LDCGB.**



Modificado de Pasqualucci *et al*, 2003a.

Se desconocen las consecuencias funcionales de las mutaciones del gen *BCL-6* en linfocitos B del CG normales, pero se ha visto que la sustitución de nucleótidos específicos asociada a LDCGB puede desregular la transcripción del producto proteico del gen interrumpiendo la autorregulación negativa (Wang *et al*, 2002; Pasqualucci *et al*, 2003b).

## Actividad biológica de la proteína BCL-6.

*BCL-6* codifica para una fosfoproteína nuclear de 95 kD que pertenece a la familia de factores de transcripción con dominios de dedos de zinc BTB-POZ (Chang *et al*, 1996; Seyfert *et al*, 1996). *BCL-6* contiene seis dominios de dedos de zinc (DZ) Cys<sub>2</sub>-Hys<sub>2</sub> en el extremo C (Kerckaert *et al*, 1993). Esta proteína funciona como un potente represor de transcripción. Se une directamente a secuencias específicas en el ADN mediante el dominio de DZ en el extremo C y recluta complejos correpresores específicos con el dominio POZ en el extremo N.

La expresión de *BCL-6* es sobre-regulada de 3 a 4 veces en los linfocitos B del centro germinal en ganglio linfático normal (Baron 2002). En los tejidos neoplásicos que sufren alteraciones de la región 3q27, se desregula la expresión de *BCL6*, sin embargo no se ha podido relacionar el nivel de expresión con la presencia de rearrreglos (Skinnider *et al*, 1999).

Una de las principales propiedades de la proteína *BCL-6* es su capacidad de reprimir la transcripción génica. En las células somáticas el daño al ADN inducido por factores ambientales lleva al arresto del ciclo celular y apoptosis. Esta respuesta es desencadenada por la expresión del gen *TP53* que codifica para la proteína supresora de tumores p53 (respuesta p53-dependiente) y del gen *CDKN1A* que codifica para la proteína p21 inhibidora de cinasa dependiente de ciclina (respuesta p53-independiente). Durante los procesos de hipermutaciones somáticas y cambio de clase de inmunoglobulinas en los linfocitos B del centro germinal se incrementa el número de rupturas del ADN y las células tienen riesgo de entrar en apoptosis. Existe la evidencia de que *BCL-6* inhibe la respuesta p53-dependiente reprimiendo directamente la transcripción del gen *TP53* (Phan y Dalla-Favera, 2004). Otros estudios recientes muestran que *BCL-6* se une a través del activador transcripcional Miz-1 a la región promotora del gen *CDKN1A* suprimiendo de manera activa la expresión de la p21 e inhibiendo de esta manera la respuesta p53-independiente (Phan *et al*, 2005).

## **II. HIPÓTESIS**

En muestras de tejido ganglionar de los pacientes con Linfoma Difuso de Células Grandes inmunofenotipo B se encontrará mayor número de alteraciones numéricas y/o estructurales del gen *BCL-6* dentro de la región 3q27 que en las muestras con Linfoma Folicular.

### **III. OBJETIVOS**

#### **Objetivo general:**

Comparar la frecuencia de alteraciones estructurales y numéricas del gen *BCL-6* en Linfoma Folicular y Linfoma Difuso de Células Grandes tipo B determinada mediante la técnica de hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) en muestras de tejido parafinado.

#### **Objetivos específicos:**

- Realizar extracción de núcleos de las muestras del tejido ganglionar preservado en bloques de parafina.
- Determinar la presencia de las alteraciones estructurales y/o numéricas de la región 3q27 en las muestras de tejido ganglionar usando la técnica de FISH en núcleos en interfase.
- Determinar la proporción de las aberraciones numéricas y/o estructurales del gen *BCL-6* en muestras con LDCGB y LF.

#### IV. METODOLOGÍA Y TÉCNICAS

##### Muestras.

Se utilizaron muestras de tejido parafinado de ganglios linfáticos preservados en el archivo de muestras patológicas del Instituto Nacional de Cancerología (INCAN). Para los propósitos de este trabajo se seleccionaron casos de LF y LDCGB que fueron diagnosticados durante el periodo de los años 1997-2004.

Después de evaluar cada caso, se incluyeron en el estudio sólo aquéllos que cumplieran con los criterios establecidos (Tabla 5). Se decidió excluir los casos de LF grado III debido a las diferencias morfológicas y moleculares que tienen con respecto a otros casos de LF. La presencia de alta proporción de células grandes, zonas difusas y baja frecuencia de t(14;18) los asemeja más a los LDCGB y podrían confundir el estudio, ya que se buscan diferencias categóricas entre los dos tipos de linfomas.

Tabla 5. **Criterios de selección para los casos**

<b>CRITERIOS DE INCLUSIÓN</b>	<b>CRITERIOS DE EXCLUSIÓN</b>
LF primario ganglionar grados I/II	LF grado III
LDCGB primario ganglionar	Tratamiento previo a la biopsia
	Otros padecimientos de carácter maligno

Para confirmar el diagnóstico inicial, todas las muestras fueron sometidas a evaluación de los cortes histológicos previamente teñidos con hematoxilina y eosina. El diagnóstico de LDCGB y la definición del grado de LF se realizaron siguiendo los criterios y recomendaciones establecidos en la clasificación REAL/OMS para los linfomas no-Hodgkin (Harris *et al*, 1994; Jaffe *et al*, 1998). La parte de diagnóstico morfológico e inmunohistoquímico se llevó a cabo en el Departamento de Patología del INCAN.

Aparte de los casos clínicos, se incluyeron muestras de ganglios hiperplásicos como controles para el análisis citogenético-molecular. El criterio de inclusión para los controles fue la ausencia de células malignas. Estas muestras de tejido no neoplásico se usaron para establecer el valor de corte en el análisis de FISH. En vista de que el proceso de hipermutaciones somáticas ocurre de manera fisiológica, existe cierta posibilidad de que los rearrreglos del *BCL-6* se presenten en la población celular normal.

### **Obtención de núcleos en interfase.**

La técnica de extracción de núcleos de muestras preservadas en parafina se fue modificando con el propósito de obtener una mejor calidad de señales fluorescentes durante la realización del FISH. Varios investigadores han utilizado la extracción de núcleos del tejido parafinado para el estudio de muestras patológicas con ciertas modificaciones de la técnica (Hedley *et al*, 1983; Remstein *et al*, 2000; Pickering *et al*, 2001; Paternóster *et al*, 2002). A grandes rasgos esta técnica consiste en desparafinar y disgregar los cortes finos o gruesos del tejido preservado, lo cual permite la fácil liberación de las células al ser sometidas a enzimas de digestión, obteniéndose una suspensión de núcleos individuales prácticamente libres de parafina.

La extracción de núcleos a partir de los cortes gruesos (25-40  $\mu\text{m}$ ) tiene ventajas sobre el uso de los cortes finos (3  $\mu\text{m}$ ) montados en laminillas, ya que disminuye considerablemente la cantidad de núcleos sobrepuestos, permite una mejor calidad de resolución de las señales fluorescentes, menor interferencia y por lo tanto facilita el análisis.

A continuación se describe la técnica de extracción de núcleos descrita previamente por Heiden *et al* (1991) y optimizada para este estudio. En este trabajo se utilizaron de 5 a 10 cortes de 25  $\mu\text{m}$  de grosor por muestra.

## TÉCNICA DE EXTRACCIÓN DE NÚCLEOS A PARTIR DEL TEJIDO PRESERVADO EN PARAFINA<sup>1</sup>.

### *Desparafinado:*

1. Los cortes de tejido se sometieron a 6 lavados con xilol durante 10 min c/u, en el horno a 65°C.
2. Entre lavados, el xilol fue removido con una micropipeta con cuidado de no perder el tejido.
3. El tejido se re-hidrato en serie de etanol (95%, 75% y 50% v/v) por 2 min en cada uno.
4. Después el tejido fue desintegrado manualmente con la punta de un clip largo parcialmente enderezado y desinfectado.
5. Se eliminaron los restos del etanol por evaporación, dejando secar el tejido al aire.

### *Tratamiento con proteinasa K:*

6. Se adicionaron 400 µl de solución de proteinasa K 0.005% recién preparada al tubo de microcentrífuga con los cortes desparafinados desintegrados y secos.
7. La suspensión se incubó a 37° C durante 90 min.
8. Para ayudar con la digestión enzimática las muestras fueron homogeneizadas cada 20 minutos durante 3 segundos en el agitador de tubos.
9. Las células extraídas se concentraron por centrifugación a 1200 rpm durante 10 min.
10. El sobrenadante fue retirado con la ayuda de una micropipeta, los núcleos fueron lavados por resuspensión en 400 µL de PBS. Se centrifugaron a 1200 rpm durante 10 min.

### *Fijación:*

11. El paquete celular se lavó 2 veces en 200 µL de fijador Carnoy. Se centrifugó a 1200 rpm durante 10 min.
12. El paquete celular se resuspendió en 50-100 µL de fijador Carnoy.
13. Se dejó caer una gota de la suspensión de núcleos en el centro de un portaobjetos.
14. El resto de la suspensión de los núcleos aislados se preservó a -70°C.
15. La laminilla se dejó a temperatura ambiente durante toda la noche.
16. La proporción y distribución de los núcleos se evaluó por microscopía de contraste de fases y se delimitó un área de 20x20 mm con abundante cantidad de núcleos sin sobreposición, ni restos de tejido no digerido.

---

<sup>1</sup> La información sobre los reactivos y soluciones se proporciona en el anexo al final.

El paso inicial de extracción de núcleos donde los cortes son sometidos a varios lavados con xilol a temperatura de 65° C, es el paso crítico de la técnica. Se debe lograr un buen desparafinado del tejido, lo cual depende principalmente del tipo de la parafina utilizada en la preservación, de tal manera que en algunas muestras puede ser necesario repetir el procedimiento aumentando el número de los lavados. El aumento en la temperatura o el tiempo de lavado no afectan de manera considerable el correcto desparafinado del tejido, como se observó durante el desarrollo de la técnica (datos no mostrados).

### **Detección de los rearrreglos del *BCL-6*.**

La posición telomérica de la región 3q27 hace que la determinación de las translocaciones que involucran este *locus* sea muy difícil mediante técnicas de la citogenética convencional. Además, en el estudio de los linfomas la muestra más conveniente es el tejido afectado y frecuentemente sólo se cuenta con las muestras preservadas en parafina. En estos casos el estudio de cariotipo queda descartado automáticamente, ya que no se puede realizar un cultivo celular.

El método de citogenética molecular de Hibridación *in situ* con Fluorescencia (FISH) es una opción útil para la detección de alteraciones cromosómicas en linfomas. Las ventajas principales de FISH consisten en un tiempo de preparación relativamente corto y análisis de las muestras, posibilidad de utilizar muestras congeladas o preservadas en parafina y posibilidad de detección de rearrreglos más pequeños de los que se pueden observar mediante tinción con bandas G. En el caso específico de la región 3q27, FISH es la técnica de elección para la detección de rearrreglos cromosómicos. Utilizando un diseño de sonda de ADN específico para la región es posible determinar si hay o no alteraciones de la misma, independientemente de otros cromosomas involucrados (Sanchez-Izcuierto *et al*, 2001).

## Sonda para FISH.

Para la detección del rearrreglo en el gen *BCL-6* se utilizó la sonda comercial *break-apart* bicolor LSI<sup>2</sup> BCL6 (Visys<sup>®</sup>, No.32-191016) para la región 3q27. Esta sonda consiste de dos fragmentos de ADN que se localizan en ambos lados del gen *BCL-6* (figura 5). En el extremo 5' se ubica la sonda de 300 kb marcada con fluorocromo *Spectrum Orange*<sup>®</sup> y en el extremo 3' la sonda de 600 kb marcada con *Spectrum Green*<sup>®</sup>. La estrategia de utilizar dos sondas que flanquean el gen fue desarrollada y validada por Sanchez-Izquierdo *et al*, (2001) con el objeto de identificar diferentes rearrreglos del *BCL-6* independientemente del tipo de translocación, sobre todo debido a la variedad de cromosomas con los que se transloca esa región del cromosoma 3. De tal manera que cualquier ruptura dentro del *BCL-6* se podrá visualizar como resultado la separación de las señales fluorescentes roja y verde.

Núcleos con dos señales verde/naranja fusionadas (2F) fueron definidos como normales. Núcleos con una señal fusionada y una separación de señales verde y naranja (1F1V1N) fueron definidos como núcleos con rearrreglo del *BCL-6* en 3q27. Núcleos con tres señales fusionadas (3F) se consideraron como duplicación total o parcial del cromosoma 3, y núcleos con dos señales fusionadas y una separada se consideraron como coexistencia de trisomía del cromosoma 3 y rearrreglos del *BCL-6* en uno de ellos (figura 6).

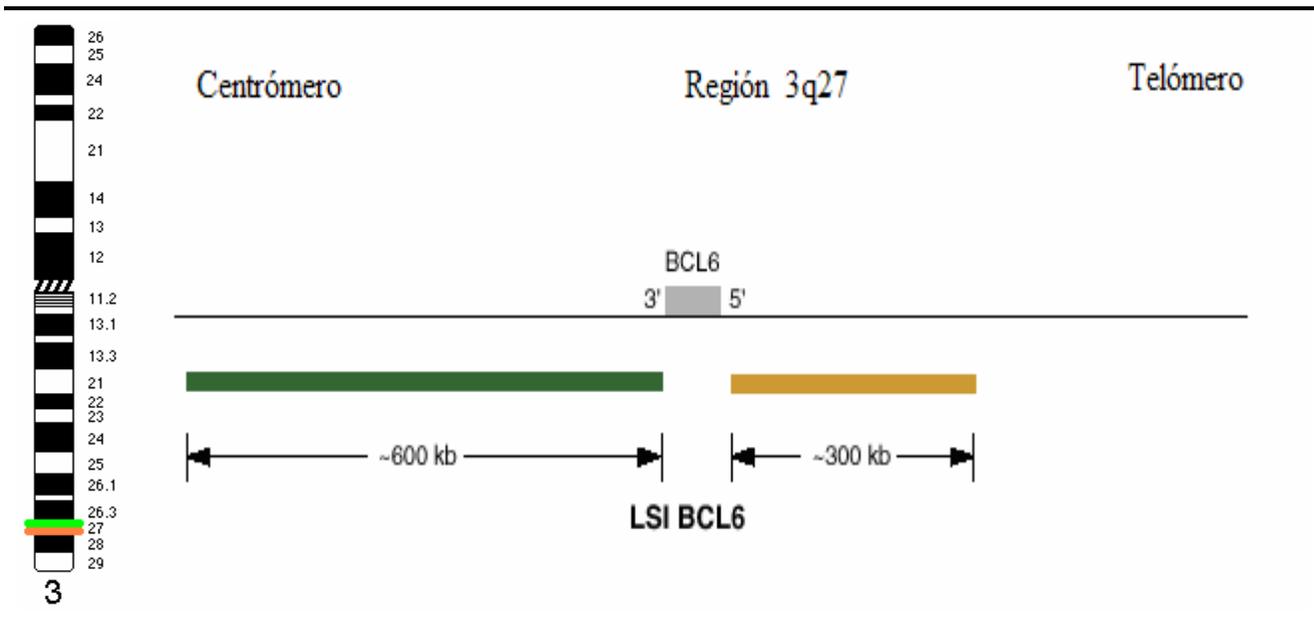
Es importante indicar que la distribución de la cromatina y la posición del núcleo durante la fijación influye en la presentación final de las señales fluorescentes. Una región 3q27 normal se puede observar como dos señales sobrepuestas (figura 7a), juntas (figura 7b), o ligeramente separadas (figura 7c), mientras que en una ruptura de *BCL-6* hay separación completa de las señales (figura 7d). Por las características propias del diseño de la sonda comercial, hay un espacio de 42 kb entre las sondas verde y naranja, esto puede ocasionar una ligera separación al momento de la lectura aun en un cromosoma normal. El criterio para definir

---

<sup>2</sup> Locus Specific Identification

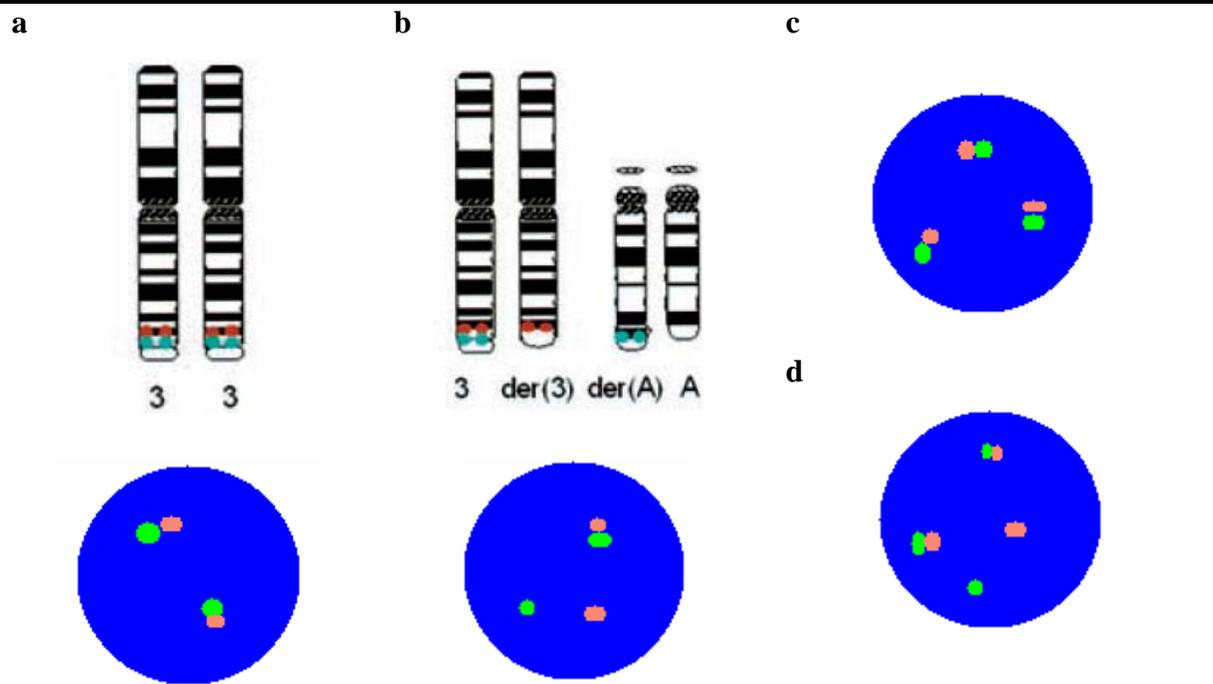
que una señal representa una ruptura verdadera del *BCL-6* se estableció considerando que la distancia entre las señales verde y naranja debe ser mayor al diámetro (D) de una señal simple en el mismo núcleo (figura 7e).

Figura 5. Características de la sonda LSI *BCL-6* de separación para la región 3q27.



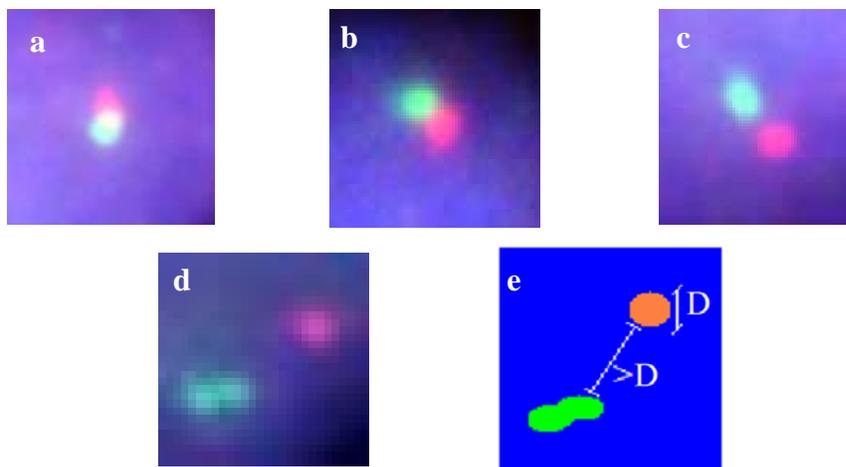
Modificado de Vysis® Product Catalog, 2005.

Figura 6. Patrones de señales esperados de la sonda LSI *BCL-6* en núcleos en interfase.



a) 2F normal; b) 1F1V1N ruptura en el *BCL-6*; c) 3F trisomía del 3; d) trisomía del 3 con ruptura en el *BCL-6*.

Figura 7. Tipos de señales de la sonda LSI *BCL-6*.



a,b,c) señales fusionadas o conjuntas que representan la región 3q27 normal; d) señales separadas que representan la ruptura del *BCL-6*; e) la distancia entre las señales debe ser mayor al diámetro de una señal para que se considere una ruptura.

## PREPARACIÓN PARA REALIZAR LA TÉCNICA DE FISH<sup>3</sup>.

### *Pretratamiento:*

1. Las laminillas se calentaron en el horno a 65° C durante 2 min y se sumergieron en la solución SSC 2X a 37° C durante 15 min
2. Los núcleos sobre las laminillas se sometieron a digestión con pepsina recién preparada a 37° C durante 8 min
3. Se deshidrataron en etanol al 70%, 85% y 100% v/v por 2 min en cada uno a temperatura ambiente

### *Co-hibridación:*

4. Se aplicaron 10 µL de la solución de la sonda LSI *BCL-6*: 1 µL de sonda, 2 µL de agua y 7 µL solución amortiguadora de hibridación (Vysis<sup>®</sup>, # Cat:30-670005)
5. Se selló el cubreobjetos con cemento Iris
6. La sonda y el ADN blanco fueron desnaturalizados simultáneamente a 80° C durante 8 min en el sistema de hibridación “Hybrite” (Vysis<sup>®</sup>, USA)
7. La hibridación se completó a 37° C durante 4-20 h en cámara húmeda del equipo de hibridación

### *Contratinción:*

8. Se retiró el cemento Iris y las laminillas fueron sumergidas en SSC 2X/ 0.1% NP-40 a temperatura ambiente aplicando ligera agitación para remover los cubreobjetos
9. Se sumergieron en SSC 0.4X/0.3% NP-40 a 75° C por 2 min
10. Se sumergieron en SSC 2X/ 0.1% NP-40 a temperatura ambiente por 1 min
11. Se adicionaron 8 µL del colorante de contraste DAPI<sup>4</sup> (Vysis<sup>®</sup>, # Cat: 30-804831), se colocó el cubreobjetos y se selló con cemento Iris.
12. Se dejó a -20° C, protegido de la luz, de 1 a 24 h

El análisis de las señales se realizó directamente en el microscopio de fluorescencia Leica<sup>®</sup> DM RXA II con lámpara de halógeno como fuente de excitación y filtros BP545/30, BP620/60 y BP340/380 para la detección de la luz emitida por los fluorocromos *Spectrum Green*, *Spectrum Orange* y DAPI, respectivamente. Con el uso del programa de cómputo QFISH se creó el archivo de imágenes de muestras de LF y LDCGB.

<sup>3</sup> La información sobre los reactivos y soluciones se proporciona en el anexo al final.

<sup>4</sup> DAPI= 4',6-Diamidino-2-fenilindol diclorhidrato, emite fluorescencia en el espectro UV

## V. RESULTADOS

El diagnóstico de LF se confirmó en los 36 casos de los que fueron seleccionados del archivo de muestras patológicas, INCAN. De éstos sólo se incluyeron 13 casos que mostraron patrón morfológico consistente con los grados I y II. Los 23 casos de LF grado III fueron descartados y excluidos del estudio. La distribución de los casos de LF de acuerdo al grado histológico se resume en la tabla 6. El diagnóstico basado en la morfología tisular y celular para las muestras seleccionadas se confirmó mediante pruebas inmunohistoquímicas. Todas presentaron valores positivos para la expresión de la proteína BCL-2 y el marcador de superficie CD20, indicando el linaje de linfocitos B.

Tabla 6. **Distribución de casos de LF por grado histológico.**

<b>GRADO</b>	<b>PACIENTES</b>
I	4/36
II	9/36
III	23/36

El tamaño de la muestra para el grupo de LDCGB se estableció con base en la cantidad de casos identificados con el diagnóstico de LF. Se seleccionaron 13 muestras con LDCGB y se confirmó el diagnóstico mediante la evaluación de morfología celular. Todas las muestras de tejido presentaron patrón característico de difusión de células grandes con pérdida de límites foliculares. El inmunofenotipo celular fue consistente con la línea celular de linfocitos B al presentar valores positivos de inmunodetección para CD20.

### **Extracción de núcleos.**

Se extrajeron núcleos celulares de las 29 muestras incluidas en el estudio (26 casos, 3 controles). La cantidad de núcleos extraídos de los cortes de tejido parafinado fue variable en

todas las muestras. Es probable que estas variaciones se atribuyan a las características propias del tejido ganglionar, tamaño de la biopsia y el tipo de parafina utilizada. La concentración de los núcleos aislados se ajustó durante la preparación de las laminillas. Se buscó un área para el análisis por FISH mediante la observación al microscopio en contraste de fases con el objetivo de 16X y se seleccionó aquella que tuviera la menor cantidad posible de núcleos sobrepuestos y restos de tejido no digerido.

## FISH

Se evaluaron 200 núcleos en cada una de las muestras, con excepción de un caso de LDCGB donde se contaron sólo 135 núcleos. En las muestras-control del tejido ganglionar se evaluaron 1000 núcleos por muestra. La mayoría de las señales fluorescentes obtenidas en cada una de las muestras mostraron buena definición e intensidad de fluorescencia de las señales y fueron fácilmente identificadas y diferenciadas.

Aplicando la sonda LSI se evidenciaron las interrupciones del gen *BCL6* en 3q27. Dicha sonda tiene además la capacidad de detectar las copias adicionales de la misma región cromosómica. Se determinó el promedio y la desviación estándar de la frecuencia de núcleos con alteraciones en la región 3q27 en las muestras de ganglios con hiperplasia (Tabla 7) con el

**Tabla 7. Determinación del valor de corte en base a resultados de FISH para 3q27 en las muestras de ganglios con hiperplasia.**

	<b>RUPTURA EN 3q27</b>	<b>TRISOMÍA 3</b>	<b>TRISOMÍA 3 CON RUPTURA EN 3q27</b>
Intervalo (%)	1.3 - 3.2	0.8 - 1.1	0.3 - 1.5
Valor promedio (%)	2.07	0.80	0.97
Desviación Estándar (%)	1.00	0.30	0.61
Valor de corte *	5.07	1.70	2.80

\* valor promedio mas 3DE

objeto de evaluar la frecuencia de falsos-positivos. El valor de corte se estableció considerando 3 desviaciones estándar sobre el promedio. De tal manera que las muestras que tuvieran más de 5.07 % de sus células con las señales 1F1V1N se consideraron positivas para la ruptura del *BCL-6*; las muestras con más de 1.7% de células con tres señales fusionadas se consideraron positivas para la trisomía del cromosoma 3 y las muestras con más de 2.8% de células con señales 2F1V1N se consideraron positivas para la asociación de ambos rearrreglos.

Los resultados de la evaluación de los núcleos en interfase con la sonda LSI para la región 3q27 en muestras de ganglios linfáticos se presentan en la tabla 8. Cabe mencionar que existe heterogeneidad de los valores observados en el grupo de los tumores de LF y LDCBG, situación que si bien también existe en los controles, es de mucha menor magnitud.

La fracción porcentual de los núcleos normales en cada muestra de LF varía entre 70.0 y 98.0% con un valor promedio de 90.0%. En el grupo de LDCGB los valores mínimo y máximo son aparentemente inferiores, de 45.5 y 97.0% con un promedio de 81.0%. Sin embargo, al realizar la comparación de fracciones de células normales entre ambos grupos aplicando la prueba *t* de Student, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p=0.100$ ).

En ambos grupos de tumores hay algunos valores extremos que sobrepasan las dos desviaciones estándar del valor promedio de células afectadas en cada grupo. Este es el caso de las muestras LF776 y LD975 para las rupturas en 3q27; LF488 y LD863 para la trisomía del 3 y LD379 para ambas alteraciones. Se realizó un ensayo estadístico de comparación en el que se eliminaron estos valores sobresalientes. Al comparar el número de células afectadas en cada grupo (LF y LDCGB) con los controles y entre sí, no se detectaron diferencias significativas ( $p>0.05$ ) en ninguna de las comparaciones.

Tabla 8. Resultados de FISH con sonda LSI para la región 3q27 en núcleos en interfase.

MUESTRA	NORMAL		RUPTURA EN 3q27*		TRISOMIA 3**		TRISOMIA 3 CON RUPTURA EN 3q27†		4 SEÑALES NORMALES		TOTAL
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	
LF776	140	70.0	58	29.0	1	0.5	1	0.5	0	0.0	200
LF488	148	73.5	4	2.0	43	21.5	4	2.0	0	0.0	200
LF345	162	81.0	8	4.0	8	4.0	0	0.0	22	11.0	200
LF527	181	90.5	0	0.0	13	6.5	6	3.0	0	0.0	200
LF848	185	92.5	11	5.5	2	1.0	2	1.0	0	0.0	200
LF526	186	93.0	5	2.5	5	2.5	4	2.0	0	0.0	200
LF764	187	93.5	5	2.5	6	3.0	2	1.0	0	0.0	200
LF354	188	94.0	2	1.0	8	4.0	2	1.0	0	0.0	200
LF780	191	95.5	6	3.0	3	1.5	0	0.0	0	0.0	200
LF495	191	95.5	7	3.5	0	0.0	2	1.0	0	0.0	200
LF563	192	96.0	5	2.5	3	1.5	0	0.0	0	0.0	200
LF947	195	97.5	2	1.0	0	0.0	3	1.5	0	0.0	200
LF769	196	98.0	1	0.5	2	1.0	1	0.5	0	0.0	200
LD863	83	41.5	0	0.0	109	54.5	8	4.0	0	0.0	200
LD975	97	48.5	99	49.5	3	1.5	1	0.5	0	0.0	200
LD610	125	62.5	10	5.0	9	4.5	21	10.5	35	17.5	200
LD361	93	68.9	4	3.0	31	23.0	7	3.5	0	0.0	135
LD379	153	76.5	5	2.5	0	0.0	42	21.0	0	0.0	200
LD169	179	89.5	5	2.5	10	5.0	4	2.0	2	1.0	200
LD222	183	91.5	4	2.0	8	4.0	5	2.5	0	0.0	200
LD111	188	94.0	7	3.5	3	1.5	2	1.0	0	0.0	200
LD941	188	94.0	4	2.0	6	3.0	2	1.0	0	0.0	200
LD275	189	94.5	6	3.0	3	1.5	2	1.0	0	0.0	200
LD733	191	95.5	2	1.0	5	2.5	2	1.0	0	0.0	200
LD354	192	96.0	2	1.0	3	1.5	3	1.5	0	0.0	200
LD030	194	97.0	2	1.0	4	2.0	0	0.0	0	0.0	200
CTRL1	945	94.5	32	3.2	8	0.8	15	1.5	0	0.0	1000
CTRL2	967	96.7	17	1.7	5	0.5	11	1.1	0	0.0	1000
CTRL3	973	97.3	13	1.3	11	1.1	3	0.3	0	0.0	1000

\* valor de corte 5.1%; \*\* valor de corte 1.7%; † valor de corte 2.8%.

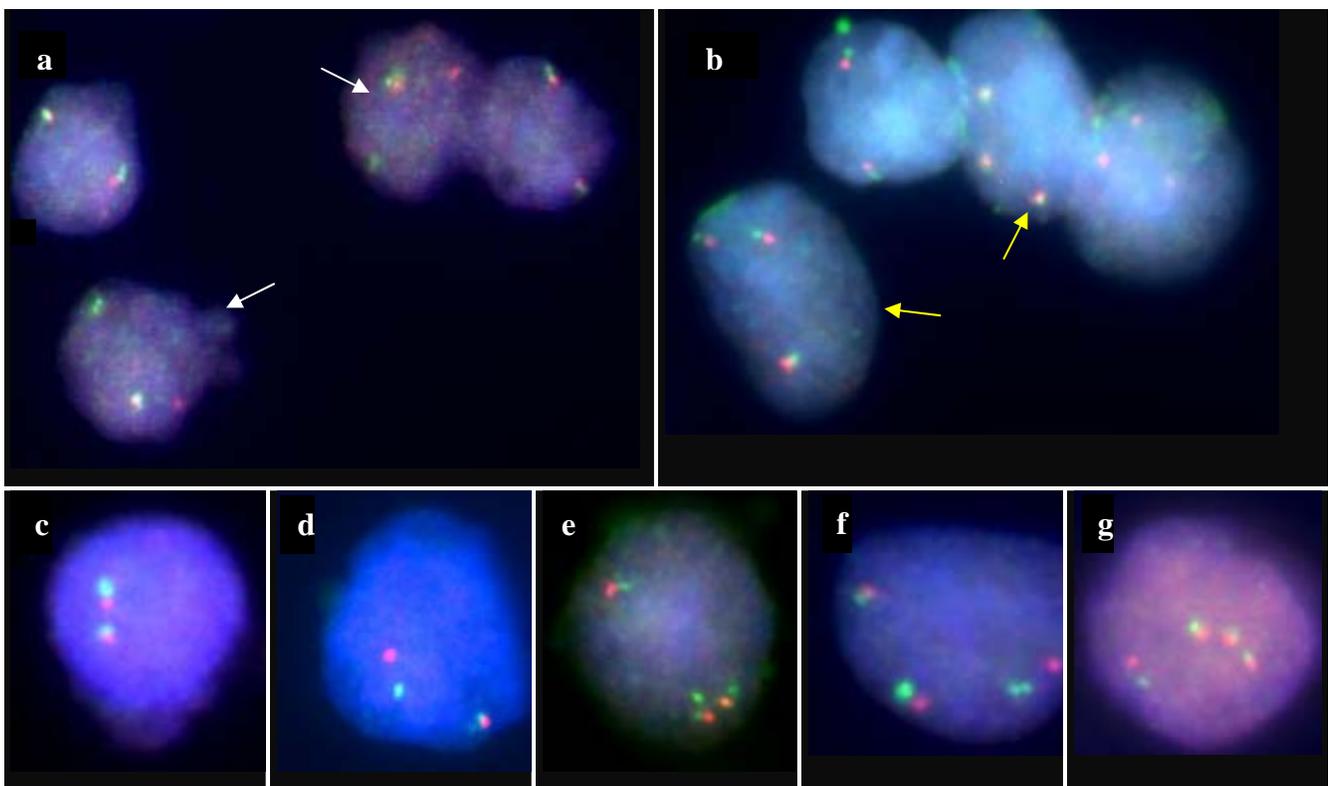
Las frecuencias de rearrreglos del gen *BCL-6* dentro de cada grupo diagnóstico fueron demostrados por la disrupción de la región 3q27 y la detección de copias adicionales de la misma región. Los resultados de las frecuencias de ganglios con alguna alteración cromosómica se resumen en la tabla 9 y se presentan en la gráfica 1. En el grupo de LF se encontraron 2 casos con rearrreglos en 3q27 presentando entre 5.5% y 29% de células positivas para la ruptura. En este grupo la trisomía del cromosoma 3 se detectó en 6 casos, con 2.5 – 21.5% de células positivas. En ninguno de los casos de LF evaluados se encontraron ambas clonas celulares al mismo tiempo (considerando los valores de corte), por lo que parecería que la trisomía del cromosoma 3 y las translocaciones de 3q27 son mutuamente excluyentes. Por otro lado, hubo un caso de LF que presentó una proporción baja (3%) de células con trisomía 3 y rearrreglo del *BCL-6* asociados. Además, se encontró un caso con 11% de células que tenían 4 señales fusionados.

El grupo con LDCGB presentó resultados de incidencia muy similares a los de LF, aunque ligeramente más altos para la mayoría de las características evaluadas. Los rearrreglos de 3q27 se encontraron solamente en un caso, pero con una proporción celular (49.5%) aparentemente más elevada que en LF. La situación es diferente para la trisomía del cromosoma 3 que se observó en 8 casos de LDCBG, donde la proporción de células positivas varía entre 2.0 y 54.5%. Al igual que para la asociación de ambas alteraciones que se detectó en 4 casos de LDCGB con valores entre 3.5 y 21.0% de células por muestra. Y por último, las células con 4 señales normales se detectaron en dos casos de LDCGB con valores de 1.0% y 17.5% respectivamente.

Se observó que en el grupo con LF, 5 casos de 13 evaluados no presentaron los rearrreglos característicos del gen *BCL-6*, ni alteraciones numéricas del cromosoma 3. De manera muy similar, 3 casos de LDCGB mostraron un patrón normal de las señales de FISH para la región 3q27.

En la figura 8 se presentan ejemplos de análisis mediante FISH en núcleos en interfase de muestras de tejido preservado en parafina con sonda LSI *BCL-6*. En la muestra de LF (figura 8a) las flechas señalan núcleos con la ruptura en la región 3q27. Se observa la señal verde/naranja que representa la región 3q27 normal y dos señales, verde y naranja, claramente separados, que indican una ruptura del cromosoma 3. En la imagen de la muestra de LDCGB (figura 8b) las flechas indican las células con tres señales fusionados, que representan trisomía del cromosoma 3. En la parte inferior de la figura se exponen ejemplos de núcleos con señales que se han encontrado durante el análisis, un núcleo normal, uno con rearrreglo del *BCL-6*, uno con trisomía del cromosoma 3 y uno con 4 señales normales (figura 8c-g, respectivamente).

**Figura 8. Detección de rearrreglos en 3q27 por FISH en núcleos en interfase.**

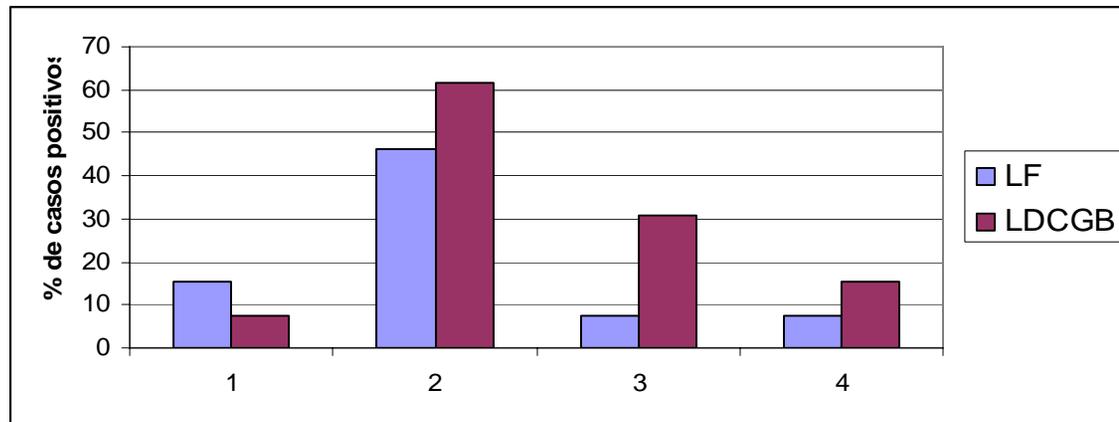


a) LF positivo para rearrreglos del *BCL-6*, los núcleos con ruptura en 3q27 se señalan con flechas blancas; b) LDCGB positivo para la trisomía del 3, las flechas amarillas indican los núcleo con tres señales fusionadas; c) ejemplo de un núcleo normal; d) núcleo con la ruptura en 3q27; e) núcleo con trisomía del cromosoma 3; f) núcleo con trisomía del 3 que además presenta ruptura en 3q27; g) núcleos con 4 señales normales.

Tabla 9. Frecuencia de individuos con alteraciones del *BCL-6* en cada grupo.

GRUPO DIAGNÓSTICO	TOTAL DE MUESTRAS CON ALTERACIONES DE 3q27		RUPTURA EN 3q27		TRISOMÍA 3		TRISOMÍA 3 CON RUPTURA EN 3q27		4 SEÑALES NORMALES	
	n	%	n	%	n	%	N	%	n	%
	LF	8/13	61.54	2/13	15.38	6/13	46.15	1/13	7.69	1/13
LDCGB	10/13	76.92	1/13	7.69	8/13	61.54	4/13	30.77	2/13	15.38

Grafica 1. Frecuencia de alteraciones del *BCL-6* en pacientes con LF y LDCGB.



1 - RUPTURA EN 3q27; 2 - TRISOMÍA DEL 3; 3 - TRISOMÍA DEL 3 CON RUPTURA EN 3q27;  
4 - 4 SEÑALES NORMALES.

## VI. DISCUSIÓN

### *Aspectos técnicos y metodológicos.*

El uso de FISH en los tejidos tumorales tiene el riesgo de observar señales erróneas en cierta proporción de los núcleos en interfase. Para conocer la proporción de estos núcleos y controlar el error de apreciación (falsos positivos y falsos negativos), se recomienda analizar una cierta cantidad de células de sujetos normales y determinar estadísticamente un valor de corte de “normalidad” (Sanchez-Izquierdo, 2001). La fidelidad de las señales observadas depende de la sonda de ADN que se utiliza, del tejido y del procedimiento de FISH, por lo tanto siempre se recomienda establecer un valor de corte en cada laboratorio y para cada observador en particular. Sánchez-Izquierdo *et al* (2001), determinaron un promedio de 0.44% (DE = 0.73%) de las señales falsas-positivas durante la validación del ensayo para la sonda de separación 3q27 en núcleos en interfase. En su caso el valor de corte que establecieron fue de 2.6%. En nuestro trabajo el valor promedio de falsos-positivos determinado fue más elevado, 2.07% (DE = 1.00%) y el valor de corte definido fue de 5.1%. Cabe mencionar que las muestras que se usaron en el ensayo de Sánchez-Izquierdo fueron de donadores sanos de sangre periférica, sin embargo, en nuestro estudio las muestras control fueron del tejido ganglionar hiperplásico. Debido a que el tejido sano en el centro germinal del ganglio está expuesto al proceso de hipermutaciones somáticas en un 30-50% de los linfocitos B (Pasqualucci *et al*, 1998; Peng *et al*, 1999), existe la posibilidad de que ocurran las rupturas en la región 3q27 en una proporción muy baja de células normales. El valor de corte determinado en otros estudios similares donde también utilizan una sonda de separación varía entre 4.5% y 10% (Paternóster *et al*, 2002; Barrans *et al*, 2002). La técnica de FISH en núcleos de interfase con sonda *break-apart* de doble color permitió cuantificar algunas alteraciones estructurales y numéricas del gen *BCL-6*. La limitante de este tipo de ensayo es que las alteraciones intracromosómicas como inversiones y deleciones intersticiales pasan desapercibidas. En el trabajo de Keller *et al*. (2006)

el uso de FISH se complementa con el cariotipo con bandas-G haciendo posible la detección de 15% de alteraciones crípticas de la región 3q27.

La extracción de núcleos facilitó considerablemente el análisis citogenético-molecular de muestras preservadas en parafina en comparación con el análisis en cortes finos. Si bien existen técnicas moleculares que utilizan el ADN extraído del tejido parafinado (Shi *et al*, 2002), en el estudio de los tumores es frecuente la necesidad de analizar células directamente. La determinación rutinaria de translocaciones en los tejidos tumorales es una de ellas. En este trabajo se lograron estandarizar las condiciones idóneas para el procesamiento de las muestras de tejido parafinado tanto en calidad como en cantidad de los núcleos extraídos.

#### *Alteraciones del 3q27 en LF y LDCG.*

Se completó el estudio citogenético-molecular de las dos entidades más frecuentes de linfomas no-Hodgkin, el linfoma folicular y linfoma difuso de células grandes B. Uno de los objetivos principales de este trabajo fue determinar si las alteraciones estructurales y numéricas del gen *BCL-6* se presentan de manera diferencial en ambos tipos de linfoma dado sus distintas características morfológicas y clínicas. La comparación del número de células con afecciones cromosómicas estudiadas entre ambos grupos de linfomas y controles no mostró diferencias significativas. Si bien el porcentaje total de alteraciones del gen *BCL-6* en LDCGB no presentó diferencias significativas con respecto a LF, fue mayor, 76% vs 61%, respectivamente.

Las alteraciones de la región 3q27 se pueden presentar en 6 a 15 % de los casos de LF (Ohno, 1997; 2004). En el presente trabajo se detectaron rearrreglos en la misma región en 3 de 13 casos de LF (23%) siendo ligeramente mayor a lo reportado. Es interesante señalar que uno de estos tres casos presentó rearrreglos además de trisomía del cromosoma 3 en la misma línea celular. Recientemente, Keller *et al* (2006) observaron translocaciones balanceadas en 3/4 y no

balanceadas en 1/4 de casos de LF grado II, siendo este último una adición en 3q27, pero no reportaron trisomía del 3 en estas células.

La frecuencia de translocaciones que involucran la región 3q27 observada en LDCGB nodulares también es variable, entre 15 y 40% dependiendo de la técnica empleada para su detección. (Bastard, *et al* 1994; Muramatsu, 1996; Willis, 2000; Kawasaki, 2001). Los investigadores del grupo de Kramer (1998) detectaron un 29% de rearrreglos en la región 3q27 usando hibridación o transferencia tipo *Southern*. En el análisis de cariotipos realizado por Skinnider *et al* (1999) en el mismo tipo de linfomas, 5 de 14 casos presentaron translocaciones en 3q27 y un caso presentó add(3q27). Dos estudios más detectaron rearrreglos del gen *BCL-6* en 20-25% de estos tumores utilizando bandas-G y FISH, todos estos casos tenían translocaciones balanceadas que involucran 3q27 (Dave *et al*, 2002; Keller *et al*, 2006). Reportes anteriores muestran una evidente predominancia de las rupturas de 3q27 en comparación con las duplicaciones de esta región o del cromosoma 3 completo. En concordancia con la literatura, en el presente trabajo se observaron 5 de 13 casos de LDCGB (38%) con ruptura en 3q27, pero además 4 de ellos también presentaban la trisomía del cromosoma 3, dato que no se discute en la mayoría de los reportes previos. La coexistencia de dos líneas celulares en el mismo tumor, una con translocación y otra con trisomía del cromosoma 3 han sido reportadas por Dierlamm *et al*, (1997). Barrans *et al* (2002), en su estudio de LDCGB ganglionar encontraron una proporción muy baja de casos (3/101) de coexistencia de ambos tipos de alteraciones. Los tres casos incluían una clona con ruptura en 3q27 y otra con ruptura y trisomía 3. En uno de los tumores de LDCGB estudiados por Keller *et al* (2006) se encontró el rearrreglo del *BCL-6* en células que además tenían dos cromosomas 3 con deleciones que no afectaron la región 3q27. De tal manera que en el análisis mediante FISH con la sonda *break-apart* bicolor se observó un patrón de las señales de 2F1G1R. En las muestras evaluadas en este estudio, el patrón anterior se observó en un caso de LF, aunque en

un porcentaje bajo de núcleos, y también en 4 casos de LDCGB. Si bien este patrón fue considerado como trisomía del cromosoma 3 donde uno de los cromosomas sufrió translocación, no se descarta la posibilidad de rearrreglos complejos de esta región que pudieran presentar el mismo patrón de las señales fluorescentes. Metodológicamente sería conveniente completar este estudio con el análisis de metafases mediante FISH y cariotipo, sin embargo el único material disponible fue de biopsias preservadas en parafina.

Adicionalmente, se observaron núcleos con trisomía 3q27 sin rupturas asociadas en un mayor porcentaje de los casos que los rearrreglos de *BCL-6* en ambos tipos de linfoma estudiados (LF: 46% vs 15%, y LDCG: 61% vs 8%, respectivamente; tabla 8). Inesperadamente 6 de 13 casos de LF presentaron trisomía como alteración única del cromosoma 3, lo cual es mucho considerando que son LF grado I/II. Es importante señalar que sólo en uno de estos 6 casos la proporción de células con trisomía 3 fue notablemente alta (21%), en otros 5 casos esta proporción estuvo cerca del valor de corte y podría deberse a los artefactos de la técnica. De manera similar, en los casos de LDCGB sólo dos casos tenían una proporción alta (23.0 y 54.5%) de células anormales con tres regiones 3q27 intactas. En general la trisomía 3 o 3q es poco frecuente en el LF y se asocia más a los eventos de transformación a linfoma de zona marginal MALT, aun sin cambios morfológicos evidentes (Totrakovic *et al*, 2006). Se sabe que la trisomía del cromosoma 3 es una alteración numérica frecuente en linfomas gástricos tipo MALT y en LDCGB extranodales, habiéndose reportado en ~ 50% de los casos utilizando técnicas de citogenética convencional (Brynes *et al*, 1996) y en hasta 85% mediante técnicas moleculares (Beà *et al*, 1999).

La función exacta del *BCL-6* en la patogénesis de linfomas no-Hodgkin todavía se desconoce. Se sabe que las alteraciones de este gen afectan las señales intracelulares para arresto del ciclo celular y apoptosis (Phan *et al*, 2005). La mayoría de las alteraciones del *BCL-6* son rearrreglos estructurales que inducen sustitución del promotor del gen por el promotor del

gen compañero de translocación (Ohno, 2004). Esto lleva a una pérdida de control de expresión del *BCL-6* deshabilitando la unión de correpresores transcripcionales como N-CoR, SMRT, SIN3A y MTA3 (Dhordaine *et al*, 1997; Wong y Privalsky, 1998; Fujita *et al*, 2004). Sin embargo, no todos los tumores de los LDCGB y aún menos de los LF presentan rearrreglos estructurales de 3q27. En estos casos también pueden presentarse mutaciones puntuales del gen *BCL-6* que podrían explicar en parte la generación del linfoma, ya que la ocurrencia de estas mutaciones es independiente de los rearrreglos generados en 3q27. La región 5' no traducida del *BCL-6* es el blanco del proceso de hipermutaciones somáticas (Migliazza *et al*, 1995) tanto en los linfocitos B normales (Pascualucci *et al*, 1998) como en 75% de las células tumorales (Lossos y Levy, 2000). Algunas de estas mutaciones son patológicas y se asocian con la expresión alterada de *BCL-6* en LDCGB (Wang *et al*, 2002). En adición a esto, algunos linfomas pueden presentar rupturas en regiones alternativas a MBC, como lo reporta Chen, *et al* (1998) ubicadas a unos 200-270 kb del MBC hacia el telómero. En el diseño de las sondas *break-apart* de doble color que se utilizaron en este trabajo, tal sitio de ruptura se encontraría aproximadamente a la mitad de la sonda marcada con *Spectrum Orange*. Esto podría crear dos señales fusionadas normales y una señal naranja adicional. En una de las muestras de LDCGB (LD375) 40 núcleos presentaron este patrón de señales (dato no mostrado) y fueron considerados como trisomía 3 con translocación (tabla 8). No se descarta la posibilidad de que estos núcleos en realidad tengan dos cromosomas 3 uno de los cuales es producto de la translocación generada en el sitio de ruptura alternativo.

Si bien *BCL-6* tiene una función importante en la regulación del ciclo celular, no es la única proteína con capacidad antiapoptótica. Los protooncogenes *PAX-5*, *C-MYC*, *RHO/TTF*, y *PIM-1* también son el blanco de las HS y pueden tener alteraciones incluyendo mutaciones en sus regiones reguladoras, algunas de las cuales se asocian con LDCGB (Pascualucci *et al*, 2001).

Los hallazgos de este trabajo no confirmaron una relación clara entre el tipo de linfoma estudiado y el número de alteraciones del gen *BCL-6* y se requieren más estudios para aclarar la interacción entre los rearrreglos del *BCL-6*, expresión del producto proteico y el fenotipo celular. Dada la existencia de reportes sobre el mal pronóstico de los rearrreglos de 3q27 (Barrans *et al*, 2002), sería de interés clínico estudiar también las alteraciones de este *locus* durante la transformación de LF a un linfoma más agresivo.

## VII. CONCLUSIONES

- No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la muestra de tejido ganglionar entre los casos de Linfoma Folicular y Linfoma Difuso de Células Grades (B) para la presencia de alteraciones en el oncogén *BCL-6*.
- Las duplicaciones de la región 3q27 solas son ligeramente más frecuentes que las rupturas de esta región en ambos tipos de linfomas evaluados.
- Los rearrreglos del *BCL-6* se pueden presentar en asociación con la duplicación de la región 3q27 en una misma clona celular del ganglio linfático.
- La técnica de extracción de núcleos de las muestras del tejido parafinado es una herramienta útil en estudios retrospectivos de las muestras anatomopatológicas mediante la técnica de FISH, al igual que el uso de sondas de separación es útil en la detección de los rearrreglos que involucran diferentes cromosomas en la translocación del gen *BCL-6*.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. **Acker B, Hoppe RT, Colby TV *et al.*** Histological conversion in the non-Hodgkin's lymphomas. *J Clin Oncol.* **1983**; 1:11.
2. **Akasaka H, Akasaka T, Kurata M *et al.*** Molecular anatomy of BCL6 translocations revealed by long distance polymerase chain reaction-based assays. *Cancer Res.* **2000**; 60: 2335–2341.
3. **Akasaka T, Lossos IS, Levy R.** Bcl-6 gene translocation in follicular lymphoma: A harbinger of eventual transformation to diffuse aggressive lymphoma. *Blood.* **2003**; 102:1443-1448.
4. **Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE *et al.*** Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature.* **2000**; 403: 503-511.
5. **Aster JC, Kobayashi Y, Shiota M *et al.*** Detection of the t(14;18) at similar frequencies in hyperplastic lymphoid tissues from American and Japanese patients. *Am J Pathol.* **1992**; 141:291–299.
6. **Australian Institute of Health and Welfare (AIHW) and Australasian Association of Cancer Registries (AACR).** Cancer in Australia 2001. Canberra: AIHW. Cancer Series. **2004**; 28.
7. **Bakshi A, Jensen JP, Godman P *et al.*** Cloning of the chromosomal breakpoint of t(14;18) human lymphomas: Clustering around JH on chromosome 14 and near a transcriptional unit on 18. *Cell.* **1985**; 41:899-906.
8. **Barrans SL.** Rearrangement of the BCL6 locus at 3q27 is an independent poor prognostic factor in nodal diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haem.* **2002**; 117:322-325.
9. **Baron BW, Anastasi J, Thirman MJ, *et al.*** The human programmed cell death-2 (PDCD2) gene is a target of BCL6 repression: implications for a role of BCL6 in the down-regulation of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2002**; 99(5):2860-2865.
10. **Bastard C, Deweindt , Kerckaert JP *et al.*** LAZ3 rearrangements en non-Hodgkin's lymphoma: correlation with histology, immunophenotype, kariotype, and clinical outcome in 217 patients. *Blood.* **1994**; 83:2423-2427.

11. **Beà S, Ribas M, Hernández JM *et al.*** Increased number of chromosomal imbalances and high-level DNA amplifications in mantle cell lymphoma are associated with blastoid variants. *Blood*. **1999**; 93:4365-4374.
12. **Bell DA, Liu Y, Cortopassi GA.** Occurrence of bcl-2 oncogene translocation with increased frequency in the peripheral blood of heavy smokers. *J Natl Cancer Inst*. **1995**; 87:223-224.
13. **Brynes RK, Almaguer PD, Leathery KE *et al.*** Numerical cytogenetics abnormalities of chromosome 3, 7 and 12 in marginal zone B-Cell lymphomas. *Mod Pathol*. **1996**; 9:995-1000.
14. **Bulter M, Corbally N, Dervan PA *et al.*** BCL6 and other genomic alterations in non-Hodgkin's lymphoma (NHL). *British Journal of Cancer*. **1997**; 75:1641-1645.
15. **Chan JCK.** The New World Health Organization Classification of Lymphomas. The past, the present and the future. *Hematol Oncol*. **2001**; 19:129-150.
16. **Chang CC, Ye BH, Chaganti RS *et al.*** BCL-6, a POZ/zinc-finger protein, is a sequence-specific transcriptional repressor. *PNAS*. **1996**; 93: 6947-6952.
17. **Chen W, Iida S, Louie DC, *et al.*** Heterologous promoters fused to BCL6 by chromosomal translocations affecting band 3q27 cause its deregulated expression during B-cell differentiation. *Blood*. **1998**; 91: 603-607.
18. **Clearly M & Sklar J.** Nucleotide sequence of a t(14;18) chromosomal breakpoint in follicular lymphoma and demonstration of a breakpoint-cluster region near a transcriptionally active locus on chromosome 18. *PNAS*. **1985**; 82(21):7439-7443.
19. **Colomer D, Moreno C, Villamor N *et al.*** Implicaciones prácticas de la biología molecular en el diagnóstico, clasificación y seguimiento clínico de los linfomas y síndromes linfoproliferativos crónicos. *Haematológica (ed esp)*. **2003**; 87(6):119-126.
20. **Dave BJ, Nelson M, Pickering DL *et al.*** Cytogenetic characterization of diffuse large cell lymphoma using multi-color fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genet Cytogenet*. **2002**; 132:125-132.
21. **De Jong D.** Molecular Pathogenesis of Follicular Lymphoma: A Cross Talk of Genetic and Immunologic Factors. *J Clin Oncol*. **2005**; 23(26):6368-6374.
22. **De Sanjose S, Dickie A, Alvaro T, *et al.*** Helicobacter pylori and malignant lymphoma in Spain. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. **2004**; 1:944-948.
23. **Dhordain P, Albagli O, Lin RJ *et al.*** Corepressor SMRT binds the BTB/POZ repressing domain of the LAZ3/BCL6 oncoprotein. *PNAS*. **1997**; 94(20):10762-10767

24. **Dierlamm J, Pittaluga, S, Stul, M et al.:** BCL6 gene rearrangements also occur in marginal zone B cell lymphoma detected by comparative genomic hybridization. *Leukemia*. **1997**; 11:747-758.
25. **Filipits M, Jaeger U, Pohl G et al.:** Cyclin D3 is a predictive and prognostic factor in diffuse large B-cell lymphoma. *Clin Cancer Res*. **2002**; 8:729-733.
26. **Foon KA y Fisher RI:** Lymphomas. In *Williams Hematology*. Lichtman MA, Beutler E, Kaushansky K *et al.* 6th ed. McGraw-Hill. **2001**; 1237-1243.
27. **Franke S, Wlodarska I, Maes B et al.** Lymphocyte predominance Hodgkin disease is characterized by recurrent genomic imbalances. *Blood*. **2001**, 97:1845–1853.
28. **Fujita N, Jaye DL, Geigerman C et al.** MTA3 and the Mi-2/NuRD complex regulate cell fate during B lymphocyte differentiation. *Cell*. **2004**; 119:75-86.
29. **Fusco JC, Setzer RW, Collard DD et al.:** Quantification of t(14;18) in the lymphocytes of healthy adult humans as a possible biomarker for environmental exposure to carcinogens. *Carcinogenesis*. **1996**; 17:1013-1020.
30. **Gravel S, Delsol G, Al Saati T.** Single-cell analysis of the t(14;18)(q32;q21) chromosomal translocation in Hodgkin's disease demonstrates the absence of this translocation in neoplastic Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Blood*. **1998**; 91:2866-2874.
31. **Gulich A, Wan X, Law M, et al.:** Risk of cancer in people with AIDS. *AIDS*. **1999**; 13: 839–843.
32. **Gulich AE & Vajdic CM.** The epidemiology of non-Hodgkin lymphoma. *Pathology*. **2005**; 37(6):409-419.
33. **Jacobson JO, Wilkes BM, Kwiatkowski DJ et al.** Bcl-2 rearrangements in *de novo* diffuse large cell lymphoma. Association with distinctive clinical features. *Cancer*. **1993**; 72:231–236.
34. **Jaffe ES.** Histopathology of the non-Hodgkin's lymphomas and Hodgkin's disease. In *The lymphomas*: Canellos GP, Lister TA, Sklar JL eds. Philadelphia: W.B. Saunders, **1998**; 77-106.
35. **Jaffe ES, Harris NL, Diebold J et al.** World Health Organization Classification of lymphomas: a work in progress. *Ann Oncol*. **1998**; 9:S25-S30.
36. **Jaffe ES, Harris NL, Diebold J et al.** World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues. A progress report. *Am J Clin Pathol*. **1999**;111(1 Suppl 1):S8-1

37. **Jaffe ES, Harris NL, Stein H et al.** Pathology and genetics of tumors of Haematopoietics and Lymphoid Tissues. Lyon. FARC Press. 2001; 56-68.
38. **Jardin F, Gaulard P, Buchonnet G, et al.** Follicular lymphoma without t(14;18) and with BCL-6 rearrangement: A lymphoma subtype with distinct pathological, molecular and clinical characteristics. *Leukemia*. **2002**; 16:2309-2317.
39. **Harris NL, Jaffe ES, Stein H et al.** A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the international Lymphoma Study Group. *Blood*. **1994**; 84:1361.
40. **Harris NL, Stein H, Coupland SE et al.** New approaches to lymphoma diagnosis, *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)*, **2001**; 194 – 220.
41. **Hedley DW, Friedlander ML, Taylor IW et al.** Method for analysis of cellular DNA content of paraffin-embedded pathological material using flow cytometry. *J Histochem Cytochem*. **1983**; 31:1333-1335.
42. **Heiden T, Wang N, Tribukait B.** An improved Hedley method for preparation of paraffin-embedded tissues for flow cytometric analysis of ploidy and S-phase. *Cytometry*. **1991**; 12:614–621.
43. **Hodgkin, T.** On some morbid appearances of the absorbant glands and spleen. *Med.-Chir. Trans*. **1832**; 17:68-114.
44. **Horning SJ & Rosenberg SA.** The natural history of initially untreated low-grade non-Hodgkin's lymphomas. *N Engl J Med*. **1984**; 311:1471-1475.
45. **Hockenbery D, Nunez G, Milliman C et al.** Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature*. **1990**; 348:334–336.
46. **Hockenbery D, Zutter M, Hickey W et al.** BCL2 protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death. *PNAS*. **1991**; 88:6961-6963.
47. **Kanzler H, Küppers R, Hansmann ML et al.** Hodgkin and Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease represent the outgrowth of a dominant tumor clone derived from (crippled) germinal center B cells. *J Exp Med*. **1996**; 184:1495-1505.
48. **Katzenberger T, Ott G, Klein T et al.** Cytogenetic alterations affecting BCL6 are predominantly found in follicular lymphomas grade 3B with a Diffuse Large B-Cell Component. *Am J Pathol*. **2004**; 167(2):481-490.
49. **Kawamata N, Miki T, Fukuda T et al.** The organization of the *BCL6* gene. *Leucemia*. **1994**; 8:1327-1333.

50. **Kawasaki C, Ohshim K, Suzumiya J *et al.*** Rearrangements of bcl-1, bcl-2, bcl-6, and c-myc in diffuse large B-cell lymphomas. *Leuk Lymphoma*. **2001**; 42:1099-1106.
51. **Keller CE, Nandula S, Vakiani E *et al.*** Intrachromosomal rearrangement of chromosome 3q27: an under recognized mechanism of BCL6 translocation in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Hum Path*. **2006**; 37:1093-1099.
52. **Kerckaert J-P, Deweindt C, Tilly H *et al.*** LAZ3, a novel zinc-finger encoding gene is disrupted by recurring chromosome 3q27 traslocations in human lymphomas. *Nat Genet*. **1993**; 5, 66-77.
53. **Kramer MHH, 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.
54. **Küppers R, Rajewsky K, Zhao M *et al.*** Hodgkin disease: Hodgkin and Reed-Sternberg cells picked from histological sections show clonal immunoglobulin gene rearrangements and appear to be derived from B cells at various stages of development. *PNAS*. **1994**; 91:10962-10966.
55. **Küppers R & Dalla-Favera R.** Mechanisms of chromosomal translocations in B cell lymphomas. *Oncogene*. **2001**; 20, 5580-5594.
56. **Küppers .** Molecular biology of Hodgkin's lymphoma. *Adv Cancer Res*. **2002**; 84:277-312.
57. **Linette GP, Li Y, Roth K, Korsmeyer SJ.** Cross talk between cell death and cell cycle progression: BCL-2 regulates NFAT-mediated activation. *PNAS*. **1996**; 93:9545-9552.
58. **Liu Y, Hernandez AM, Shibata D, *et al.***: BCL2 translocation frequency rises with age in humans. *PNAS*. **1994**; 91:8910-8914.
59. **Lo CF, Ye BH, Lista F, *et al*,** Rearrangements of the BCL6 gene in diffuse large cell non-Hodgkin's lymphoma. *Blood*. **1994**; 83:1757-1759.
60. **Lopez-Guillermo A, Cabanillas F, McDonnell TI, *et al.***: Correlation of bcl-2 rearrangement with clinical characteristics and outcome in indolent follicular lymphoma. *Blood*. **1999**; 93:3081-3087.
61. **Lossos IS & Levy R.** Mutation analysis of the 5' noncoding regulatory region of the BCL-6 gene in non-Hodgkin lymphoma: Evidence for recurrent mutations and intracloal heterogeneity. *Blood*. **2000**; 95:1400-1405.
62. **Lukes R.J., Collins R.D.** Immunologic characterization of human malignant lymphoma. *Cancer*. **1974**. 34:1488.

63. **Manns A, Cleghorn FR, Falk RT *et al***, Role of HTLV-1 in development of non-Hodgkin lymphoma in Jamaica and Trinidad and Tobago. *Lancet* **1993**; 342: 1447-1450.
64. **Marafioti T, Hummel M, Foss HD *et al***: Hodgkin and Reed-Sternberg cells represent an expansion of a single clone originating from a germinal center B-cell with functional immunoglobulin gene rearrangements but defective immunoglobulin transcription. *Blood*. **2000**; 95:1443-1450,
65. **Martin-Subero JI, Renne C, Grohmann S *et al.***: Chromosomal rearrangements affecting the BCL6, MYC and MALT1 loci are rare events in classical Hodgkin lymphoma. *Eur J Hematol*. 2004; 73:B23, (suppl 65).
66. **McDonnell T, Deane N. Platt F *et al.*** Bcl-2 immunoglobulin transgenic mice demonstrate extended B cell survival and follicular lymphoproliferation. *Cell*. **1989**; 57:79.
67. **Migliazza A, Martinotti S, Chen W, *et al.*** Frequent somatic hypermutation of the 5V noncoding region of the BCL6 gene in B-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1995**; 92:12520-12524.
68. **Mueller N.** Overview of the epidemiology of malignancy in immune deficiency. *JAIDS* **1999**; 21: S5–10.
69. **Muramatsu M, Akasaka T, Kadowaki N, *et al.*** Rearrangement of the BCL6 gene in B-cell lymphoid neoplasms: comparison with lymphomas associated with BCL2 rearrangement. *Br J Haematol* **1996**; 93:911-920.
70. **Nakamura Y.** Internal deletions within the BCL6 gene in b-cell non Hodgkin's lymphoma. *Leuk & Lymph*. **2000**; 38(5-6) : 505-512.
71. **Ohno H, Kerckaert JP, Bastard C *et al.*** Heterogeneity in B-cell neoplasms associated with reorganization of the *LAZ3* gene on chromosome band 3q27. *Jap J Canc Res*. **1994**; 85:592-600.
72. **Ohno H & Fukuhara S.** Significance of rearrangement of the BCL6 gene in B-cell lymphoid neoplasms. *Leuk Lymphom*. **1997**; 27:53-63.
73. **Ohno H.** Pathogenetic role of BCL6 translocation in B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Histol Histopathol*. **2004**; 19:637-650.
74. **Offit, K., Jhanwar, S., Ebrahim, S.A.D. *et al***, t(3;22)(q27;q11): A novel translocation associated with diffuse non-Hodgkin's lymphoma. *Blood*. **1989**; 74:1876-1879.
75. **Offit, K., Chaganti, R.S.K.** Chromosomal Abberations in non-Hodgkin's lymphoma. Biological and clinical correlations. *Hematol Oncol Clin North Am*. **1991**; 5:853-869.

76. **Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J et al.** Cancer Incidence in Five Continents. In International Agency for Research on Cancer (IARC). **2003**. Lyon. IARC Scientific Publication. 155 (VII).
77. **Pasqualucci L, Migliazza A, Fracchiolla N, et al.** Bcl-6 mutations in normal germinal center B-cells: evidence of somatic hypermutation acting outside Ig loci. PNAS. **1998**; 95: 11816 – 11821.
78. **Pasqualucci L, Neumeister P, Goossens T et al.** Hypermutation of multiple proto-oncogenes in B-cell diffuse large-cell lymphomas. Nature. **2001**; 412(6844):341-346.
79. **Pasqualucci L, Bereschenko O, Niu H et al.** Molecular Pathogenesis of Non-Hodgkin's Lymphoma: the Role of BCL-6. Leuk Lymph. **2003a**; 44(S3):S5-S12.
80. **Pasqualucci L, Migliazza A, Basso K et al.** Mutations of the BCL-6 proto-oncogene disrupt its negative autoregulation in diffuse large B-cell lymphoma. Blood. **2003b**; 101, 2914-2923.
81. **Paternoster SF, Brockman SR, McClure R et al.:** A new method to extract nuclei from paraffin-embedded tissue to study lymphomas using interphase fluorescence *in situ* hybridization. Am J Path. **2002**; 160:1967-1972.
82. **Peng H-Z, Du M-Q, Koulis A, et al.** Nonimmunoglobulin gene hypermutation in germinal center B cells. Blood. **1999**; 93:2167.
83. **Penn I.** Sarcomas in organ allograft recipients. Transplantation. 1995; 60: 1485-91.
84. **Pickerinin D, Nelson M, Chan W et al.** Paraffin tissue core sectioning: an improved technique for whole nuclear extraction and interphase FISH. J Assoc Genet Technol. **2001**; 27:38-39.
85. **Pileri SA, Ascani S, Leoncini L et al:** Hodgkin's lymphoma: The pathologist's viewpoint. J Clin Pathol. **2002a**; 55:162-176.
86. **Pileri SA, Dirnhofer S, Went Ph et al.** Diffuse large B-cell lymphoma: one or more entities? Present controversies and possible tools for its subclassification. Histopathology. **2002b**; 41, 482-509.
87. **Phan RT & Dalla-Favera R:** The proto-oncogene suppresses p53 expression in germinal-center B cells. Nature. **2004**; 432:635-639.
88. **Phan RT, Saito M, Basso K et al.** BCL6 interacts with the transcription factor Miz-1 to suppress the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 and cell cycle arrest in germinal center B cells. Nat Immun. **2005**; 6:1054-1060.

89. **Poulsen CB, Borup R, Nielsen FC *et al.*** Microarray-based classification of diffuse large B-cell lymphoma. *Eur J Haematol.* **2005**; 74: 453-465.
90. **Remstein ED, Kurtin PJ, Buno I *et al.*** Diagnostic utility of fluorescens *in situ* hybridization in mantle-cell lymphoma. *Br J Haematol.* **2000**; 110:856-862.
91. **Reed, DM.** On the pathological changes in Hodgkin's disease, with especial reference to its relation to tuberculosis. *Johns Hopkins Hosp. Rep.* **1902**; 10:133-196.
92. **Sanchez-Izquierdo D, Siebert R, Harder L *et al.***: Detection of translocations affecting the *BCL6* locus in B cell non-Hodgkin's lymphoma by interphase fluorescence *in situ* hybridization. *Leukemia.* **2001**; 15:1475–1484.
93. **Scherr PA, Mueller NE.** Non-Hodgkin lymphoma. In: *Cancer Epidemiology and Prevention.* Schottenfeld D, Fraumeni J Jr editors. New York: Oxford University Press, **1996**; 920-945.
94. **Seyfert VL, Allman D, He Y *et al.*** Transcriptional repression by the protooncogene BCL-6. *Oncogene.* **1996**; 12: 2332-2342.
95. **Shen HM, Peters A, Baron B *et al.*** Mutation of BCL-6 gene in normal B cells by the process of somatic hypermutation of Ig genes. *Science.* **1998**; 280:1750-1752.
96. **Shi SR, Cote RJ, Liu C *et al.*** DNA extraction from archival formalin-fixed, paraffine-embedded tissue sections based in the antigen retrieval principle: heating under the influence of pH. *J Histochem Cytochem.* **2002**; 50(8):1005-1011.
97. **Skinnider, BF; Horsman, DE; Dupuis, B; Gascoyne, RD.** Bcl-6 and Bcl-2 protein expression in diffuse large B-cell lymphoma and follicular lymphoma: correlation with 3q27 and 18q21 chromosomal abnormalities. *Hum Pathol.* 1999; 30:803-808.
98. **Sternberg, C.** Über eine eigenartige unter dem Bilde der Pseudoleukämie verlaufende Tuberculose des lymphatischen Apparates. *Heilk.* 1898; 19:21-90.
99. **Tilly H, Rossi A, Stamatoullas A *et al.*** Prognostic Value of Chromosomal Abnormalities in Follicular Lymphoma. 1994. *Blood*, 84(4):1043-1049.
100. **Torlakovic EE, Aamot HV, Heim S.** A marginal zone phenotype in follicular lymphoma with t(14;18) is associated with secondary cytogenetic aberrations typical of marginal zone lymphoma. *J Pathol.* **2006**; 209(2):258-264.
101. **Tsujimoto T, Cossman J, Jaffe E, *et al.*** Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science.* **1985**; 288:1440.

102. **Tsujimoto Y, Finger L, Yunis J *et al.*** Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science*. **1984**; 226(4678):1097-1099.
103. **The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project:** A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma. *Blood*. **1997**; 89:3909-3918.
104. **Vega F & Medeiros J.** Chromosomal translocations involved in non-Hodgkin Lymphomas. *Arch Path Lab Med*. **2003**; 127:1148-1160.
105. **Vitolo U, Gaidano G, Botto B *et al.*** Rearrangements of BCL6, BCL2, c-myc and 6q deletion en B-diffuse large-cell lymphoma: clinical relevance in 71 patients. *Ann. Onc*. **1998**; 9:55-61.
106. **Vysis® Product Catalog.** An Abbott Laboratorios Company. Illinois, USA. **2005**; 32.
107. **Vose, J. M.** Current approaches to the management of non-Hodgkin's lymphoma. *Semin. Oncol*. **1998**; 25, 483-491.
108. **Wang X, Li Z, Naganuma A *et al.*** Negative autoregulation of BCL-6 is bypassed by genetic alterations in diffuse large B-cell lymphomas. *PNAS*. **2002**; 99:15018–15023.
109. **Weber-Matthiesen K, Deerberg J, Poetsch M *et al,*** Numerical chromosome aberrations are present within the CD30- Hodgkin and Reed-Sternberg cells in 100% of analyzed cases of Hodgkin's disease. *Blood*. **1995**; 86:1464-1468.
110. **Willis TG & Dyer MJ.** The role of immunoglobulin translocations in the pathogenesis of B-cell malignancies. *Blood*. **2000**; 96:808-822.
111. **Wlodarska I, Nooyen P, Maes B *et al,*** Frequent occurrence of *BCL6* rearrangements in nodular lymphocyte predominance Hodgkin lymphoma but not in classical Hodgkin lymphoma. *Blood*. **2003**; 101(2):706.
112. **Wong CW & Privalsky ML.** Components of the SMRT corepressor complex exhibit distinctive interactions with the POZ domain oncoproteins PLZF, PLZF-RARalpha, and BCL-6. *J Biol Chem*. **1998**; 273(42):27695-702.
113. **Xu WS, Liang RH, Srivastava G.** Identification and characterization of BCL6 translocation partner genes in primary gastric high-grade B-cell lymphoma: heat shock protein 89 alpha is a novel fusion partner gene of BCL6. *Genes Chromosomes Cancer*. **2000**;27(1):69-75.

114. **Ye BH, Chaganti S, Chang CC *et al.*** Chromosomal translocations cause deregulated BCL6 expression by promoter substitution in B cell lymphoma. *EMBO J* **1995**; 14: 6209–6217.
115. **Yunis JJ, Frizzera G, Oken MM, McKenna J, Theologides A, Arnesen M.** Multiple recurrent genomic defects in follicular lymphoma. A possible model for cancer. *N Engl J Med.* **1987**; 316:79–84.
116. **Zinzani PL, Dimhofer S, Sabattini E *et al.*** Identification of outcome predictors in diffuse large B-cell lymphoma. Immunohistochemical profiling of homogeneously treated *de novo* tumors with nodal presentation on tissue micro-arrays. *Haematologica.* **2005**; 90:341-347.

## ANEXO

### *PREPARACIÓN DE SOLUCIONES*

#### **Fijador Carnoy (1:3)**

Metanol absoluto (JT Baker <sup>®</sup> , # Cat: 9049-03)	10 mL
Acido acético glacial (Fermont <sup>®</sup> , # Cat: 03015)	30 mL

#### **Solución amortiguadora para proteinasa K**

Tris base 0.05M (Promega <sup>®</sup> , # Cat: H5131)	6.1g
Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O (JT Baker <sup>®</sup> , # Cat: 4040-01) 0.01 M	3.7g
NaCl (JT Baker <sup>®</sup> , # Cat: 4058-01) 0.01 M	0.58 g
H <sub>2</sub> O destilada	cbp 1L
Ajustar el pH a 7.0	

#### **Solucion de proteinasa K 0.1 %**

Proteinasa K 30 U/mg (Promega <sup>®</sup> , # Cat: 64201)	10 mg
Solución amortiguadora para proteinasa K	10 mL
mantener a -20°C	

#### **Solucion de proteinasa K 0.005 %**

Solución de proteinasa K 0.1 %	50 µL
H <sub>2</sub> O destilada	cbp 1 mL

#### **SSC (solución amortiguadora de cloruro/citrato de sodio ) 2X:**

NaCl (JT Baker <sup>®</sup> , # Cat: 4058-01) 3 M	17.5 g
Na <sub>3</sub> Citrate·2H <sub>2</sub> O (Gibco <sup>®</sup> , # Cat: 15584-014) 0.3 M	8.8 g
H <sub>2</sub> O destilada	cbp 1L
ajustar el pH a 7.0	

**SSC 2X/NP-40 0.1%**

SSC 2X	40 mL
NP-40 (Vysis <sup>®</sup> , # Cat: 32-804850)	40 µL

**SSC 0.4X/NP-40 0.3%**

SSC 2X	8 mL
H <sub>2</sub> O destilada	cbp 40 mL
NP-40 (Vysis <sup>®</sup> , # Cat: 32-804850)	120 µL

**SI (Solución Isotónica)**

NaCl (JT Baker <sup>®</sup> , # Cat: 4058-01) 0.9%	9 g
H <sub>2</sub> O destilada	1000 mL

**PBS (Solución amortiguadora de fosfatos)**

NaCl (JT Baker <sup>®</sup> , # Cat: 4058-01) 137 mM	8 g
KCl (JT Baker <sup>®</sup> , # Cat: 4058-01) 2.7 mM	0.2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (JT Baker <sup>®</sup> , # Cat: 3824) 4.3 mM	1.15 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (JT Baker <sup>®</sup> , # Cat: 3246-20) 1.4 mM	0.2 g
H <sub>2</sub> O destilada	cbp 1 L

**Pepsina 0.4%**

Pepsina 1:10000 (Sigma <sup>®</sup> , # Cat: P-7000)	0.6677 g
SI	40 mL
ajustar el pH a 1.5	