



**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

Implicación de la expresión condicional de HGAL en modelos murinos de linfoma de células grandes B difuso

Tutor:

Prof. Dr. Jesús María Hernández Rivas

Javier Raboso Gallego

Universidad de Salamanca - CSIC

Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer

Salamanca, 2023

Parte del trabajo presentado en la presente Tesis Doctoral ha sido publicado en el siguiente artículo original (**Anexo 1**)¹:

Raboso-Gallego J, Casado-García A, Jiang X, Isidro-Hernández M, Gentels A, Natkunam Y, Blanco O, Dominguez V, Pintado B, Alonso-Lopez D, De Las Rivas J, Vicente-Dueñas C, Lossos I, Sanchez-Garcia I. Conditional expression of HGAL leads to the development of diffuse large B-cell lymphoma in mice. *Blood* 2021; Vol. 137, nº 13, p. 1741–1753.

D. Jesús María Hernández Rivas, catedrático de la Universidad de Salamanca, investigador científico en el Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer (IBMCC) y facultativo del Servicio de Hematología del Hospital Universitario de Salamanca.

CERTIFICA:

Que el trabajo de Tesis Doctoral titulado **‘Implicación de la expresión condicional de HGAL en modelos murinos de linfoma de células grandes B difuso’**, ha sido llevado a cabo bajo su dirección en el Instituto de Biología y Molecular del Cáncer y reúne, según su criterio, los estándares de calidad, rigor y originalidad suficientes para ser presentado y defendido ante el tribunal pertinente, optando así, al título de Doctor en Biociencias por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, y a los efectos oportunos, expide el presente certificado en Salamanca a 9 de abril de 2023.

Fdo. Prof. Dr. Jesús María Hernández Rivas

La investigación de este proyecto está financiada parcialmente por la Federación Española de Enfermedades Raras (FEDER), contrato ‘Miguel Servet’ (CPII19/ 00024 - AES 2017-2020) del Instituto de Salud Carlos III (Ministerio de Economía y Competitividad), ‘Fondo de Investigaciones Sanitarias/ Instituto de Salud Carlos III’ (PI17/00167). Asimismo, la investigación se ve sufragada por SAF2015-64420-R del Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO)/FEDER, Reglamento (UE), RTI2018-093314- B-I00 del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades de España (MCIU)/Agencia Estatal de Investigación (AEI)/FEDER, UE, por la Junta de Castilla y León (UIC-017, CSI001U16, y CSI234P18), y por la Fundación Carreras Alemana (DJCLS; R13/26 y DJCLS 02R/2016). Además, el laboratorio es miembro de *EuroSyStem* y de la Red DECIDE, financiados por la Unión Europea bajo el programa FP7. El grupo recibe apoyo de la Oficina Federal Alemana de Radiación (BfS) (FKZ: 3618S32274). También, se ha contado con el apoyo del Fondo Social Europeo (FSE)-Consejería de Educación de la Junta de Castilla y León (CSI067-18), los Institutos Nacionales de Salud, Instituto Nacional del Cáncer (subvención 1R01CA233945), el Programa de Financiación Interno del *Sylvester Comprehensive Cancer Center* de la Universidad de Miami, por las Fundaciones Familias Dwoskin y Anthony Rizzo y por la Fundación Jaime Erin, Consorcio de Investigación del Linfoma Folicular.

Durante la realización de este proyecto de Tesis Doctoral he logrado una resolución favorable en la **Convocatoria del Programa Propio III: ‘Ayudas para Contratos Predoctorales de la Universidad de Salamanca cofinanciadas por el Banco de Santander’**. Esta convocatoria fue resuelta definitivamente por la Comisión Permanente del Consejo de Gobierno de la Universidad de Salamanca, en el punto 7 del Orden del día: ‘Informes y propuestas del Consejo de Investigación’ a 24 de abril de 2020.

Me gustaría expresar mi gratitud a todas aquellas personas que, a lo largo de estos años, me han ayudado a llegar hasta aquí, contribuyendo a mi desarrollo tanto personal como profesionalmente y que han hecho posible que este trabajo pueda ver la luz.

Primeramente, me gustaría dar las gracias al Dr. Jesús María Hernández Rivas, mi Director de Tesis durante este último curso académico. Sin su compromiso y profesionalidad, este trabajo no habría sido posible.

A todos los investigadores con los que he colaborado en numerosos seminarios, congresos y publicaciones. En este sentido, dar las gracias especialmente al Dr. Izidore Lossos del *Sylvester Comprehensive Cancer Center* de la Universidad de Miami por permitirme colaborar en este proyecto, así como la posterior publicación de resultados en forma de artículo sobre la que se sustenta la presente Tesis Doctoral.

A los Dres. Francisco Javier García Criado y M.^a Begoña García Cenador, responsables del laboratorio de Cirugía Experimental de la Facultad de Medicina de la Universidad de Salamanca, por su colaboración y ayuda con los trabajos de experimentación animal, así como al Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca.

A todos los Servicios y Unidades de Apoyo a la Investigación: Genómica, Proteómica, Microscopía, Esterilización, Bioinformática y Diagnóstico. Todos ellos han hecho que el trabajo y la rutina sean mucho más llevaderos.

A todas y cada una de las personas que se han volcado, implicado e involucrado mucho más allá de lo estrictamente necesario durante todo este proceso: Eva, Nieves, Xoxé, Isabel, Fermín, Mario, Daniel, Atanasio, Almudena, Mamen y Marga.

A Vanesa, mi conserje de confianza, por los momentos, los cafés, los planes y charlas distendidas que han hecho más agradable mi paso por el CIC.

A mis amigos de acogida: Ángel, Beas, Nuria, Marta, Irene, Óscar y Jesús. De una manera u otra habéis sabido llegar hasta mí y hacerme sentir como en casa, a veces incluso, hasta habéis ejercido de terapeutas.

A mis amigas, pilares y apoyos de confianza: Elena, Verónica, Raquel, Marta y Chari. Llegasteis a mi vida en momentos muy diferentes y, sin embargo, todas habéis sabido entenderme, arroparme y estar siempre, incluso cuando no era consciente de ello.

A mi familia mirandesa: Maribel, Jesús, Marian, Emilio, Joaquín, Maite, Clara, Alberto y Aitana Jr. Nunca pensé que las raíces llegaran tan lejos. Gracias por darme una oportunidad y hacerme sentir tan querido en mi nuevo hogar.

A mi familia: Paca, Eugenio, Evelia, Lorenzo, Fide, Bea, Rocío y Roci. Todos vosotros sabéis, en menor o mayor medida, como soy y me habéis visto crecer, aceptando mis defectos y potenciando mis virtudes.

A mi familia con mayúsculas: Mamá, Papá, Geñi, Ana y Pablo. Me conocéis más que nadie y sabéis que lo sois todo para mí. Este camino no habría tenido sentido sin vosotros, pues me habéis tendido la mano y ayudado a cada paso, cada decisión y cada día de mi caótica forma de entender la vida. Todo esto es por y para vosotros. Gracias por haberme acompañado hasta aquí.

A mamá, desde que me regalaste la vida, no has sido capaz de parar una infinita maquinaria de amor, cariño y paciencia. Tú/nuestra forma de sentir, vivir y apreciar las cosas de nuestro entorno nos ha hecho frágiles y sensibles. No recuerdo ni un solo momento feliz en el que no hayas estado o formado parte, de una u otra forma. Me has dado siempre alas, confianza y nunca me has dejado de enseñar. Te quiero de todas y cada una de las formas posibles.

Finalmente, a Pablo. Tú eres el artífice de todo esto y sin ti jamás habría llegado hasta el final de la meta. Ya sabes que te quiero, respeto y admiro a partes iguales. Gracias por enseñarme a querer bien y libremente, por hacerme valorar lo que soy y por no cansarte de tenderme la mano, una y otra vez. La vida es mejor contigo, lleve la razón o no. Sé que no ha sido fácil para ti y esta historia no ha sido, precisamente, un camino de rosas. Lo bonito de juntarnos para hacer zumo de mandarina es que me haces sentir el hombre más afortunado del mundo.

A mi familia y a Pablo

‘Si alguna vez la vida te maltrata, acuérdate de mí, que no puede cansarse de esperar aquel que no se cansa de mirarte’

Luis García Montero, ‘Almudena’

Índice de Contenidos

Índice de contenidos

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	3
GLOSARIO DE TÉRMINOS Y ABREVIATURAS	9
RESUMEN Y PALABRAS CLAVE	19
1. RESUMEN	19
2. PALABRAS CLAVE.....	20
ABSTRACT & KEYWORDS	21
1. ABSTRACT	21
2. KEYWORDS.....	22
INTRODUCCIÓN	25
1. LINFOMA: EPIDEMIOLOGÍA, ETIOLOGÍA Y CLASIFICACIÓN	25
1.1. <i>Características, etiología y epidemiología del linfoma</i>	25
1.1. <i>Clasificación, historia y clínica del linfoma</i>	27
2. LINFOMA DE CÉLULAS GRANDES B DIFUSO	32
2.1. <i>Linfomas no Hodgkin (LNH)</i>	32
2.2. <i>LCGBD: epidemiología, clasificación y etiopatogenia</i>	35
2.3. <i>LCGBD: célula de origen, clínica y modelos experimentales</i>	39
3. EL GEN DEL LINFOMA ASOCIADO A CENTRO GERMINAL HUMANO (HGAL)	43
3.1. <i>HGAL: origen y expresión</i>	43
3.2. <i>Estructura, biología y funcionalidad de HGAL</i>	44
3.3. <i>HGAL y etiopatogenia del LCGBD</i>	47
HIPÓTESIS	61
OBJETIVOS	67
MATERIAL Y MÉTODOS	71
1. GENERACIÓN DE CEPAS DE RATÓN.....	71
2. GENOTIPADO DE CEPAS DE RATÓN MEDIANTE SOUTHERN BLOT	73
3. GENOTIPADO DE CEPAS DE RATÓN MEDIANTE PCR.....	74
3.1. <i>Genotipado de cepas de ratón mediante PCR de GFP</i>	74
3.2. <i>Genotipado de cepas de ratón mediante PCR de neo</i>	75
3.3. <i>Genotipado de cepas de ratón mediante PCR de Sca1-Cre</i>	75
3.4. <i>Genotipado de cepas de ratón mediante PCR de Mb1-Cre</i>	76
3.5. <i>Genotipado de cepas de ratón mediante PCR de Aid-Cre</i>	77
4. ANÁLISIS E IDENTIFICACIÓN DE POBLACIONES CELULARES	77
4.1. <i>Análisis de poblaciones celulares por citometría de flujo</i>	77
4.2. <i>Análisis de la formación del centro germinal</i>	79
4.3. <i>Análisis histológico e inmunohistoquímico</i>	79
4.4. <i>Estudios in vitro de la función de HGAL</i>	80
5. ANÁLISIS Y EXTRACCIÓN A PARTIR DE TEJIDOS HEMATOPOYÉTICOS	81
5.1. <i>Análisis de expresión proteica mediante Western Blot</i>	81
5.2. <i>Extracción de ADN</i>	82
5.3. <i>Análisis de clonalidad por reordenamiento de inmunoglobulinas</i>	82
5.4. <i>Extracción de ARN</i>	83
5.5. <i>Síntesis de ADNc</i>	84
5.6. <i>Perfil de expresión génica de los tumores murinos</i>	84
6. ANÁLISIS, TRATAMIENTO E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS	84
6.1. <i>Análisis bioinformático</i>	84
6.2. <i>Preparación de librerías de exoma murino y secuenciación</i>	86
6.3. <i>Análisis estadístico de supervivencia global y específica</i>	87

RESULTADOS	91
1. GENERACIÓN DE CEPAS MURINAS CON EXPRESIÓN CONDICIONAL DE <i>HGAL</i>	91
2. PERFIL HISTOPATOLÓGICO E INMUNOHISTOQUÍMICO DE MODELOS MURINOS CON GANANCIA FUNCIONAL DE HGAL 100	
3. CARACTERIZACIÓN DE LCGBD ASOCIADO A SOBREENPRESIÓN DE HGAL.....	107
3.1. <i>Desarrollo de LCGBD en los grupos experimentales</i>	107
3.2. <i>Perfil de expresión génica de las muestras tumorales</i>	109
3.3. <i>Identificación del perfil mutacional del LCGBD murino</i>	114
DISCUSIÓN	108
CONCLUSIONES	122
BIBLIOGRAFÍA	128
ANEXOS	154
1. ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN DERIVADO DE LA TESIS DOCTORAL.....	154
2. ESTADO MICROBIOLÓGICO DE LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	155

*Índice de figuras
y tablas*

Índice de figuras y tablas

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	3
GLOSARIO DE TÉRMINOS Y ABREVIATURAS	9
RESUMEN Y PALABRAS CLAVE	19
1. RESUMEN	19
2. PALABRAS CLAVE.....	20
ABSTRACT & KEYWORDS	21
1. ABSTRACT	21
2. KEYWORDS.....	22
INTRODUCCIÓN	25
1. LINFOMA: EPIDEMIOLOGÍA, ETIOLOGÍA Y CLASIFICACIÓN	25
1.1. <i>Características, etiología y epidemiología del linfoma</i>	25
Figura 1. Tasas de incidencia y mortalidad de linfoma Hodgkin y no Hodgkin por grupos de edad ajustadas por raza, etnia y sexo en Estados Unidos durante el periodo 2015-2019.	27
1.1. <i>Clasificación, historia y clínica del linfoma</i>	27
Figura 2. Clasificación y tipos de linfoma según la OMS conforme a la versión actualizada del sistema REAL (Revised European-American Lymphoma Classification), para la clasificación de síndromes linfoproliferativos	28
2. LINFOMA DE CÉLULAS GRANDES B DIFUSO	32
2.1. <i>Linfomas no Hodgkin (LNH)</i>	32
Figura 3. Vías de señalización implicadas en los linfomas no Hodgkin.	32
Tabla 1. Indicaciones aprobadas por la FDA para nuevos fármacos en el tratamiento de los linfomas no Hodgkin.....	34
2.2. <i>LCGBD: epidemiología, clasificación y etiopatogenia</i>	35
Figura 4. Esquema representativo de la relación entre transcriptómica, taxonomía basada en criterios genéticos y microambiente inmuno-tumoral.	39
2.3. <i>LCGBD: célula de origen, clínica y modelos experimentales</i>	39
Figura 5. Interacción molecular entre las células tumorales del linfoma de células grandes B difuso y el microambiente tumoral y su implicación en la patogenia tumoral.	40
Figura 6. Modelo ideal de ratón transgénico para el estudio del LCGBD.	42
3. EL GEN DEL LINFOMA ASOCIADO A CENTRO GERMINAL HUMANO (HGAL)	43
3.1. <i>HGAL: origen y expresión</i>	43
Figura 7. Expresión de HGAL medida por RT-PCR en tejidos, líneas celulares y neoplasias hematológicas.	44
3.2. <i>Estructura, biología y funcionalidad de HGAL</i>	44
Figura 8. Expresión de HGAL durante la formación del centro germinal.....	47
3.3. <i>HGAL y etiopatogenia del LCGBD</i>	47
Figura 9. Representación esquemática de la ontogenia del linaje B en la médula ósea	50
Figura 10. Formación del centro germinal.....	51
Figura 11. Esquema representativo de la señalización del complejo del receptor de células B.....	54
HIPÓTESIS	61
OBJETIVOS	67
MATERIAL Y MÉTODOS	71
1. GENERACIÓN DE CEPAS DE RATÓN.....	71
Figura 12. Seguimiento de las cepas de ratones generadas.	72
2. GENOTIPADO DE CEPAS DE RATÓN MEDIANTE SOUTHERN BLOT	73
3. GENOTIPADO DE CEPAS DE RATÓN MEDIANTE PCR.....	74
3.1. <i>Genotipado de cepas de ratón mediante PCR de GFP</i>	74
3.2. <i>Genotipado de cepas de ratón mediante PCR de neo</i>	75
3.3. <i>Genotipado de cepas de ratón mediante PCR de Sca1-Cre</i>	75
3.4. <i>Genotipado de cepas de ratón mediante PCR de Mb1-Cre</i>	76
3.5. <i>Genotipado de cepas de ratón mediante PCR de Aid-Cre</i>	77

4.	ANÁLISIS E IDENTIFICACIÓN DE POBLACIONES CELULARES	77
4.1.	<i>Análisis de poblaciones celulares por citometría de flujo</i>	77
	Figura 13. Estrategia de <i>gating</i> empleada para el análisis por citometría de flujo.....	78
4.2.	<i>Análisis de la formación del centro germinal</i>	79
4.3.	<i>Análisis histológico e inmunohistoquímico</i>	79
4.4.	<i>Estudios in vitro de la función de HGAL</i>	80
5.	ANÁLISIS Y EXTRACCIÓN A PARTIR DE TEJIDOS HEMATOPOYÉTICOS	81
5.1.	<i>Análisis de expresión proteica mediante Western Blot</i>	81
5.2.	<i>Extracción de ADN</i>	82
5.3.	<i>Análisis de clonalidad por reordenamiento de inmunoglobulinas</i>	82
5.4.	<i>Extracción de ARN</i>	83
5.5.	<i>Síntesis de ADNc</i>	84
5.6.	<i>Perfil de expresión génica de los tumores murinos</i>	84
6.	ANÁLISIS, TRATAMIENTO E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS	84
6.1.	<i>Análisis bioinformático</i>	84
6.2.	<i>Preparación de librerías de exoma murino y secuenciación</i>	86
6.3.	<i>Análisis estadístico de supervivencia global y específica</i>	87
	RESULTADOS	91
1.	GENERACIÓN DE CEPAS MURINAS CON EXPRESIÓN CONDICIONAL DE <i>HGAL</i>	91
	Figura 14. Expresión condicional del gen <i>HGAL</i>	92
	Figura 15. Expresión condicional del gen <i>HGAL</i> restringida a diferentes compartimentos hematopoyéticos.	94
	Figura 16. Expresión de GFP y <i>HGAL</i> en ratones <i>Rosa26^{HGAL}</i>	95
	Figura 17. Desarrollo hematopoyético normal en ratones jóvenes <i>Rosa26^{HGAL}/Aid-Cre</i> , <i>Rosa26^{HGAL}/Sca1-Cre</i> y <i>Rosa26^{HGAL}/Mb1-Cre</i>	96
	Figura 18. Desarrollo hematopoyético normal en ratones jóvenes según su expresión de <i>HGAL</i>	97
	Tabla 2. Número total de células B B200 ⁺ y porcentaje de células B de centro germinal (GCB) en ratones inmunizados.....	98
	Figura 19. Cuantificación de células B de centro germinal (GCB) en el día 10 tras la inmunización con SRBC.	99
2.	PERFIL HISTOPATOLÓGICO E INMUNOHISTOQUÍMICO DE MODELOS MURINOS CON GANANCIA FUNCIONAL DE <i>HGAL</i> 100	
	Figura 20. Examen macroscópico del bazo de ratones <i>Rosa26^{HGAL}/Sca1-Cre</i> tumorales.....	100
	Figura 21. Análisis inmunohistoquímico de bazos el día 10 después de la inmunización con SRBC.....	101
	Figura 22. Linfomas de células B en ratones <i>Rosa26^{HGAL}/Aid-Cre</i>	102
	Figura 23. Linfomas de células B en ratones <i>Rosa26^{HGAL}/Sca1-Cre</i>	103
	Figura 24. Linfomas de células B en ratones <i>Rosa26^{HGAL}/Mb1-Cre</i>	104
	Figura 25. Linfomas de células B en ratones con expresión condicional de <i>HGAL</i>	105
	Figura 26. Tinción IHC de BCL6 de amígdala humana sana y bazo murino <i>WT</i> inmunizado.....	106
3.	CARACTERIZACIÓN DE LCGBD ASOCIADO A SOBREEXPRESIÓN DE <i>HGAL</i>	107
3.1.	<i>Desarrollo de LCGBD en los grupos experimentales</i>	107
	Figura 27. Linfomas de células B en ratones <i>Rosa26^{HGAL}</i>	108
3.2.	<i>Perfil de expresión génica de las muestras tumorales</i>	109
	Figura 28. Identidad molecular de células tumorales en ratones <i>Rosa26^{HGAL}/Sca1-Cre</i>	110
	<i>Rosa26^{HGAL}/Mb1-Cre</i>	111
	Figura 29. Identidad molecular de esplenocitos <i>Rosa26^{HGAL}/Mb1-Cre</i>	111
	Figura 30. Identidad molecular de esplenocitos <i>Rosa26^{HGAL}/Aid-Cre</i>	112
	Figura 31. Análisis de enriquecimiento (GSEA) de las firmas transcripcionales (HALLMARKS) de bazos de ratón con expresión condicional de <i>HGAL</i>	113
	Figura 32. La expresión de <i>HGAL</i> reduce la expresión de la proteína BCL6 tras la estimulación del BCR... 114	
3.3.	<i>Identificación del perfil mutacional del LCGBD murino</i>	114
	Tabla 3. Muestras tumorales caracterizadas por secuenciación de exoma completo (WES).....	115
	Tabla 4. Mutaciones somáticas adquiridas en tumores <i>Rosa26^{HGAL}/Sca1-Cre</i> y <i>Rosa26^{HGAL}/Mb1-Cre</i> (n=8).	116
	Figura 33. Secuenciación representativa de tres tumores murinos.	116
	Figura 34. Representación gráfica de mutaciones somáticas adquiridas en modelos murinos con expresión condicional de <i>HGAL</i>	117

DISCUSIÓN	108
Figura 35. Expresión de M-17, análogo murino de <i>HGAL</i> , en los distintos compartimentos hematopoyéticos.	110
Figura 36. La expresión condicional de <i>HGAL</i> conduce al desarrollo de LCGBD en ratones.	118
CONCLUSIONES	122
BIBLIOGRAFÍA	128
ANEXOS.....	154
1. ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN DERIVADO DE LA TESIS DOCTORAL.....	154
2. ESTADO MICROBIOLÓGICO DE LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	155

Glosario de términos y

Abreviaturas

Glosario de términos y abreviaturas

A

ADN/DNA	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN copia
Ag	Antígeno
AID	Desaminasa de citosina inducida por activación
AKT	RAC (familia Rho)-alfa serina/treonina-proteína quinasa
ALCL	Linfoma anaplásico de células grandes
APC	Alofocianina
APRIL	Ligando de TNF inductor de proliferación
ARHGEF1	Factor 1 intercambiador de nucleótidos de guanina Rho
ARN/RNA	Ácido ribonucleico

B

BAD	Agonista de muerte celular asociado a BCL2
BAFF	Factor activador de células B
BCL	Proteína del linfoma de células B
BCR	Receptor de células B
BLIMP/PRDM	Proteína 1 con dedos de zinc del dominio PR
BLNK	Proteína conectora de células B
BRD2	Proteína 2 con bromodominio
BTK	Tirosina quinasa de <i>Bruton</i>
B220	Receptor de CD45 marcador de células B

C

CARD11	Dominio 11 de reclutamiento de la Caspasa
CAR-T	Receptor de antígeno quimérico de linfocitos T

C

C57BL/6J	Cepa endogámica común de ratón de laboratorio
CD	Clúster de diferenciación
CIN85	Cbl-interacting 85-kDa protein
C-Kit/CD117	Factor de células madre
CLL	Leucemia linfocítica crónica
CLP	Progenitor linfoide común
CMP	Progenitor mieloide común
Cre	Cre recombinasa
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
CSC	Célula madre del cáncer
CSR	Recombinación específica de clase
CTL/T-CD8⁺	Linfocito T citotóxico CD8 ⁺
CTCL/LCCT	Linfoma cutáneo de células T

D

ddH₂O	Agua bidestilada
DLBC/LCGBD	Linfoma de células grandes B difuso
ABC-DLBCL	LCGBD de células B activadas
GCB-DLBCL	LCGBD de centro germinal
DLBCL-NOS	LCGBD no especificado
DTT	Ditiotreitol

E

ECM	Matriz extracelular
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
E2F	Factor de transcripción implicado en el control del ciclo celular
ELP	Progenitor linfoide temprano
ESC	Célula madre embrionaria

F

FACS	Separación celular por activación por fluorescencia
FAS	<i>Fas Cell Surface Death Receptor</i>
FCS	Suero fetal bovino
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FDC	Célula dendrítica folicular
FDR	Tasa de descubrimiento de falsos positivos
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FL/LF	Linfoma folicular
FOXP1	<i>Forkhead box protein P1</i>

G

GAPDH	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
GC	Centro germinal
GCB	Célula B del centro germinal
GCET	<i>Germinal center B cell-expressed transcript</i>
GEF	Factor intercambiador de nucleótidos de guanina
GEP	Perfil de expresión génica
GFP	Proteína de fluorescencia verde
GNA13	Subunidad alfa 13 de proteína de unión a nucleótidos de guanina
GRB2	Proteína 2 unida al receptor del factor de crecimiento
Gr-1	Marcador de diferenciación mieloide
GSEA	Análisis de enriquecimiento mediante de grupos de genes
GSK3	Glucógeno sintasa quinasa 3
GTP	Guanosina trifosfato

H

HDAC	Histona desacetilasa
HE	Hematoxilina y eosina

H

HGAL	Linfoma asociado a centro germinal humano
HL/LH	Linfoma Hodgkin
HLA	Antígeno leucocitario humano
HRP	Peroxidasa de rábano picante
HSC	Célula madre hematopoyética
HSC/PC	Célula madre/progenitora hematopoyética

I

ICOS	Coestimulador de células T inducible
Ig	Inmunoglobulina
IHC	Inmunohistoquímica
IKK	IkB quinasa
IL	Interleucina
IRES	Sitio de entrada interno ribosomal
IRF4	Factor 4 regulador del interferón
ITAM	<i>Modified immunoreceptor tyrosine- based activation motif</i>
ITIM	<i>Modified immunoreceptor tyrosine- based inhibitory motif</i>

J

JAK/STAT	<i>Janus kinase/signal transducers and activators of transcriptions</i>
-----------------	---

K

kb	Kilobase
-----------	----------

L

LARG	Factor intercambiador de guanina Rho asociado a la leucemia
LMO2	<i>Lim domain only 2</i>
LYN	Tyrosine-Protein Kinase Lyn de la familia Src
Ly6	Antígeno linfocitario

M

Mac-1/CD11b	Antígeno de macrófagos
MALT	Tejido linfoide asociado a mucosas
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógeno
Mb	Megabase
Mb1	Antígeno de membrana plasmática de células B
MCL/LCM	Linfoma de células del manto
MCL-1	Proteína 1 de diferenciación celular de leucemia mieloide inducida
MHC-I/II	Complejo principal de histocompatibilidad de clase I/II
Mir-155	Micro ARN 155
MO/BM	Médula ósea/ <i>Bone Marrow</i>
MPP	Progenitor multipotente
MPW	Agua <i>Millipore</i>
mTORC1	Diana mamífera/mecanística del complejo 1 de la rapamicina
MYC	<i>Myelocytomatosis</i>
MYD88	Factor 88 de diferenciación mieloide
MZL/LZM	Linfoma de la zona marginal

N

NFAT	Factor nuclear de las células T activadas
NFKBIA	<i>Nuclear Factor of Kappa Light Chain Gene Enhancer In B-Cells</i>
NGS	Secuenciación de nueva generación
NHL/LNH	Linfoma no Hodgkin

N

NK *Natural killer*

O

OCT Medio de montaje para criostatos

OMS Organización Mundial de la Salud

P

PAX5 *Paired Box 5*

Pb Par de bases

PBS Tampón fosfato salino

PCR Reacción en cadena de la polimerasa

PDE4DIP *Phosphodiesterase 4D Interacting Protein*

PD/PD-L Muerte celular programada/ligando de muerte celular programada

PCR Reacción en cadena de la polimerasa

PDZ Dominio estructural común de 80-90 aminoácidos

PE Ficoeritrina

PerCP Peridina clorofila

PET Tomografía por emisión de positrones

PI Yoduro de propidio

PI3K Fosfoinositol 3-quinasa

PIM1 *Pim-1 Proto-Oncogene, Serine/Threonine Kinase*

PIR-B Receptor similar a la inmunoglobulina leucocitaria

PKA/C Proteína quinasa A/C

PLC γ 2 Fosfolipasa C γ 2

PMBCL Linfoma primario mediastínico de células B

PNA Aglutinina de cacahuete

P2RY8 Miembro 8 de la familia del receptor P2Y

PTCL/LPCT Linfoma periférico de células T

P

PTNFL	Linfoma folicular ganglionar de tipo pediátrico
PTPN6	<i>Protein Tyrosine Phosphatase Non-Receptor Type 6</i>

R

RAB10	Proteína de unión a GTP asociada a Ras
RAC1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
RCLB	Tampón de lisis de eritrocitos
REAL	<i>Revised European-American Lymphoma Classification</i>
RGS1	Regulador 1 de la señalización de proteínas G
Riz	Dedo de zinc que interactúa con la proteína de la retinoblastoma
RMN	Resonancia magnética nuclear
RPA	Proteína de replicación A
RT-PCR	PCR a tiempo real/cuantitativa

S

SAM	<i>Significance Analysis of Microarrays</i>
Sca1	Antígeno de células madre 1
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico
SHIP	<i>SH2-containing inositol-5-phosphatase</i>
SHM	Hipermutación somática
SHP1	Proteína tirosina fosfatasa 1
SINE	Inhibidor selectivo de la exportación nuclear
SIRP2	Proteína beta 2 reguladora de la señal
SLL/LLP	Linfoma linfocítico pequeño
S1PR2	Receptor 2 de esfingosina-1-fosfato
SRBC	<i>Sheep red blood cell</i>
SYK	Tirosina quinasa esplénica

T

Ter-119	Marcador de superficie eritroide
TAC	Tomografía axial computarizada
TACI	Activador transmembrana e interactor CAML
TCL	Leucemia/linfoma de células T
TCR	Receptor de células T
TGF-β	Factor de crecimiento transformante β
T_h-CD4⁺	Linfocito T cooperador CD4 ⁺
T_{fh}	Linfocito T cooperador folicular
T_{fr}	Linfocito T folicular regulador
T-LL	Linfoma linfoblástico de células T
TNF	Factor de necrosis tumoral

U

UTR	Región no traducida
UV	Ultravioleta

V

VAV	
VEGF-A	Factor de crecimiento de endotelio vascular A
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana

W

WES	Secuenciación de exoma completo
WT	<i>Wild-Type</i> , tipo silvestre, control

X

XBP1 Proteína de unión a X-box 1

Resumen y Palabras

Clave/Abstract & Keywords

Resumen y Palabras Clave

1. Resumen

Los linfomas de células grandes B difusos (LCGBD) son tumores clínicamente y genéticamente heterogéneos. La desregulación de diversos procesos biológicos específicos de las células B, como la señalización del receptor de células B (BCR) y la regulación de la motilidad, contribuyen a la linfomagénesis. La proteína HGAL (del inglés *human germinal associated lymphoma*) es una proteína adaptadora específica de las células B que controla su motilidad y la señalización del BCR. En las células B normales, el gen *HGAL* se expresa en el centro germinal y rápidamente es reprimido. La mayoría de los LCGBD, principalmente los del centro germinal (GCB), aunque en menor medida los de tipo activado (ABC), expresan HGAL.

Para investigar las consecuencias de la expresión constitutiva de HGAL *in vivo*, generamos ratones que expresaban condicionalmente HGAL humano en diferentes etapas del desarrollo hematopoyético usando 3 enfoques restringidos mediados por la recombinasa Cre para iniciar la expresión de HGAL en las células madre hematopoyéticas, las células pro-B o las células B del centro germinal. Tras la estimulación inmunológica, se observaron centros germinales más grandes en ratones en los que se inició la expresión de HGAL en células B del centro germinal, lo que puso de evidencia su implicación en el proceso tumorigénico: en el examen macroscópico estos animales presentaban una marcada esplenomegalia causada por grandes tumores, independientemente del promotor que controla la expresión de HGAL. Los tres modelos de ratón desarrollaron LCGBD con una frecuencia del 12% al 30% a partir de los 13 meses, lo que condicionó una supervivencia más corta: 21 meses, 20 meses y 16 meses de supervivencia específica media las cohortes de *Rosa26^{HGAL}/Aid-Cre*, *Rosa26^{HGAL}/Mbl-Cre* y *Rosa26^{HGAL}/Sca1-Cre*, respectivamente. Los estudios inmunohistoquímicos revelaron que todos los linfomas eran del tipo BGC, con infiltración nodular difusa de los órganos afectados por grandes células linfoides pleomórficas que expresaban B220, PAX5, HGAL, PNA e IRF4.

Además, en estos modelos murinos la sobreexpresión condicionada de HGAL dio lugar a una evidente afectación extraganglionar con afectación del hígado y de los ganglios linfáticos en los ratones *Rosa26^{HGAL}/Sca1-Cre*, del riñón y del páncreas en los ratones *Rosa26^{HGAL}/Mbl-Cre* y del riñón y del hígado en los ratones *Rosa26^{HGAL}/Aid-Cre*. El estudio de *microarrays* puso de manifiesto la presencia de una marcada expresión diferencial entre las células con linfoma y los esplenocitos B normales en la que destacaba una sobreexpresión del regulador de la señalización de proteína G1 (*RGS1*), relacionado con la regulación de la migración celular y de *RAB10*. El análisis de los genes expresados diferencialmente entre las células esplénicas B de los tres modelos murinos en comparación con ratones control de la misma camada reveló un enriquecimiento en genes comunes a los tres modelos entre los que destacaba una sobreexpresión en los linfomas de la señalización de mTORC1, la respuesta de interferón, las dianas E2F y la señalización de la vía IL-6/JAK/STAT3.

La secuenciación del exoma completo de 8 muestras de tumores murinos reveló la presencia de 124 mutaciones sin-sentido o de sentido erróneo en 110 genes, con una media de 15 por tumor (número similar a la mediana de 17 alteraciones genéticas por tumor encontradas en los LCGBD humanos). Algunos de los genes mutados ya habían sido descritos previamente en tumores humanos del tipo LCGBD, con 18 mutaciones detectadas previamente, de forma recurrente, en un 0.7% de los LCGBD humanos : *PIMI*, *GNAI3*, *FAS*, *PDF4DIP*, *NFKBIA* y *PTPN6*. Posteriormente, la secuenciación del ARN mostró que todos los tumores murinos analizados expresaban BCL6. Es posible que la ausencia de expresión de BCL6 en algunos tumores con expresión de HGAL pudiera deberse a la estimulación mejorada del BCR con HGAL en estos tumores, tal y como se ha descrito en algunos estudios que muestran una disminución en la expresión de proteína proteica de BCL6. El análisis del reordenamiento de las inmunoglobulinas confirmó que todos los tumores de células B eran clonales y tenían mutaciones somáticas independientemente del impulsor del promotor encargado de la expresión de HGAL. Nuestros resultados demuestran que la expresión forzada constitutiva de HGAL conduce al desarrollo de LCGBD de tipo BCG.

2. Palabras Clave

LCGBD, HGAL, centro germinal, expresión condicional, células B, exoma

Abstract & Keywords

1. Abstract

Diffuse large B-cell lymphomas (DLBCL) are clinically and genetically heterogeneous tumors. Dysregulation of various biological processes specific to B cells, such as B cell receptor (BCR) signaling and regulation of motility, contribute to lymphomagenesis. Human germinal associated lymphoma (HGAL) protein is a specific adapter protein of B cells that controls their motility and BCR signaling. In normal B cells, the HGAL gene is expressed in the germinal center and is rapidly repressed. Most DLBCL, mainly those of the germinal center (GCB), although to a lesser extent those of the activated type (ABC), express HGAL.

To investigate the consequences of constitutive expression of HGAL *in vivo*, we generated mice conditionally expressing human HGAL at different stages of hematopoietic development using 3-restricted Cre recombinase-mediated approaches to initiate HGAL expression in hematopoietic stem cells, pro-B or B cells of the germinal center. After immunological stimulation, larger germinal centers were observed in mice in which the expression of HGAL was initiated in B cells of the germinal center, which evidenced its involvement in the tumorigenic process: in the macroscopic examination these animals presented a marked splenomegaly caused by large tumors, regardless of the promoter that controls HGAL expression. The three mouse models developed DLBCL with a frequency of 12% to 30% from 13 months, leading to a shorter survival: 21 months, 20 months and 16 months of median specific survival in the *Rosa26^{HGAL}/Aid-Cre*, *Rosa26^{HGAL}/Mb1-Cre* and *Rosa26^{HGAL}/Sca1-Cre* cohorts, respectively. Immunohistochemical studies revealed that all the lymphomas were of the SLNB type, with diffuse nodular infiltration of the affected organs by large pleomorphic lymphoid cells expressing B220, PAX5, ALGH, PNA, and IRF4.

In addition, in these mouse models conditioned overexpression of HGAL resulted in evident extranodal involvement with involvement of the liver and lymph nodes in *Rosa26^{HGAL}/Sca1-Cre* mice, kidney and pancreas in *Rosa26^{HGAL}/Mb1-Cre* mice and kidney and liver in *Rosa26^{HGAL}/Aid-Cre* mice.

The microarray study revealed the presence of a marked differential expression between cells with lymphoma and normal B splenocytes, in which an overexpression of the regulator of signaling protein G1 (*RGS1*), related to the regulation of cell migration and *RAB10*. Analysis of differentially expressed genes between spleen B cells of the three mouse models compared with littermate control mice revealed an enrichment in genes common to all three models notable among them was an overexpression of B signaling in lymphomas of mTORC1, interferon response, E2F targets, and IL-6/JAK/STAT3 signaling pathway.

Whole-exome sequencing of 8 murine tumor samples revealed the presence of 124 nonsense or missense mutations in 110 genes, with a mean of 15 per tumor (like the median of 17 genetic alterations per tumor found in the human DLBCL). Some of the mutated genes had already been previously described in human LCGBD-type tumors, with 18 mutations previously detected, recurrently, in 0.7% of human DLBCL: *PIMI*, *GNAI3*, *FAS*, *PDF4DIP*, *NFKBIA*, and *PTPN6*. Subsequently, RNA sequencing showed that all murine tumors analyzed expressed BCL6. It is possible that the absence of BCL6 expression in some tumors with HGAL expression could be due to the enhanced stimulation of the BCR with HGAL in these tumors, as has been described in some studies showing a decrease in the expression of HGAL protein. Immunoglobulin rearrangement analysis confirmed that all B-cell tumors were clonal and had somatic mutations, regardless of the promoter drive responsible for HGAL expression. Our results demonstrate that constitutive forced expression of HGAL leads to the development of GCB-DLBCL.

Our results demonstrate that constitutive forced expression of HGAL leads to the development of DLBCL.

2. Keywords

DLBCL, HGAL, germinal center, conditional expression, B cells, exome

Introducción

Introducción

1. Linfoma: epidemiología, etiología y clasificación

1.1. Características, etiología y epidemiología del linfoma

‘Linfoma’ es un término general empleado para describir neoplasias hematológicas que se originan en el sistema linfático. En ocasiones, aunque menos utilizado, se le denomina ‘tumor hematológico sólido’ para diferenciarlo de la leucemia^{2,3}. El tejido linfoide se localiza esencialmente en los ganglios linfáticos, por lo cual este tipo de tumor maligno suele presentar, de forma general, ganglios linfáticos hipertrofiados. No obstante, estos tumores no se encuentran restringidos a los ganglios linfáticos porque el sistema linfático también comprende el bazo, el timo y la médula ósea³⁻⁶. Además, dado que las células de tipo linfoide se hallan distribuidas por todo el organismo, el linfoma puede afectar a multitud de órganos extralinfáticos, tales como el hígado o el pulmón^{4,7}.

Los dos tipos principales de linfoma son^{3,8-10}:

1. **El linfoma de Hodgkin (LH)**¹¹⁻¹³, descrito por *Thomas Hodgkin* en 1832, que suele diseminarse de forma ordenada de un grupo de ganglios linfáticos a otros. Con la aplicación del tratamiento quimioterápico adecuado, este tumor se cura en la mayor parte de las ocasiones y se dispone de un anticuerpo monoclonal anti CD30 (Brentuximab Vedotin), para los casos que recaen o son refractarios a la primera línea de tratamiento. Tiene cuatro tipos histológicos y es de origen B.
2. **Los linfoma no hodgkinianos (LNH)**¹⁴⁻¹⁶, caracterizados por la ausencia de células de Reed-Sternberg a nivel histopatológico, lo que lo diferencia del LH. Su incidencia comenzó a aumentar a partir de 1990. A diferencia del LH, los LNH tienen muchos tipos histológicos y pueden ser de estirpe B, T o NK.

Ambos tipos de linfomas pueden ocurrir en cualquier momento del desarrollo, diagnosticándose tanto en niños, como en adolescentes y adultos¹⁵⁻¹⁸.

El LH es mucho más frecuente en adultos jóvenes, mientras que los LNH se dan en adultos mayores de 50 años¹⁹.

Actualmente, no se conocen las causas de la mayoría de los linfomas, pero sí existen numerosas investigaciones que describen la asociación entre determinados factores externos (biológicos, físicos, ambientales...) y la aparición de la enfermedad^{8,20-25}. Así, se ha observado un aumento notable del riesgo de padecer linfoma en pacientes infectados por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), la asociación entre la infección viral por el virus de *Epstein Barr* o por el virus linfotrópico humano de células T y el desarrollo de linfoma, un riesgo mayor en individuos infectados por *Helicobacter pylori* o *Borrelia burgdorferi* (responsable de la enfermedad de *Lyme*) y los linfomas marginales, así como un mayor riesgo de padecer LNH en individuos expuestos a altos niveles de radiación ionizante o el aumento del riesgo de sufrir linfoma de Hodgkin en individuos con antecedentes familiares y la asociación entre la presencia de determinados componentes en los herbicidas y plaguicidas y la aparición de la enfermedad linfoide^{17,26}.

En términos generales, la mayoría de los casos de linfoma aumentan su incidencia y prevalencia con la edad, debutando los pacientes con una media de 65 años. Asimismo, el LH es más frecuente en mujeres, mientras que los LNH son más prevalentes en hombres^{17,27-29}. A nivel global, el linfoma es un tipo de tumor maligno que presenta una prevalencia superior al millón de personas en todo el mundo. Concretamente, los LNH ostentan el tercer puesto de los cánceres con una mayor tasa de crecimiento, por debajo del melanoma y del cáncer de pulmón^{16-18,26}. Anualmente, la incidencia de este tipo de neoplasia hematológica maligna se incrementa un 3% y, desde comienzos del s. XXI supone la quinta causa de muerte por cáncer, con una incidencia anual cercana a los 60.000 nuevos casos diagnosticados en países desarrollados como Estados Unidos (**Figura 1**)^{14,30}.

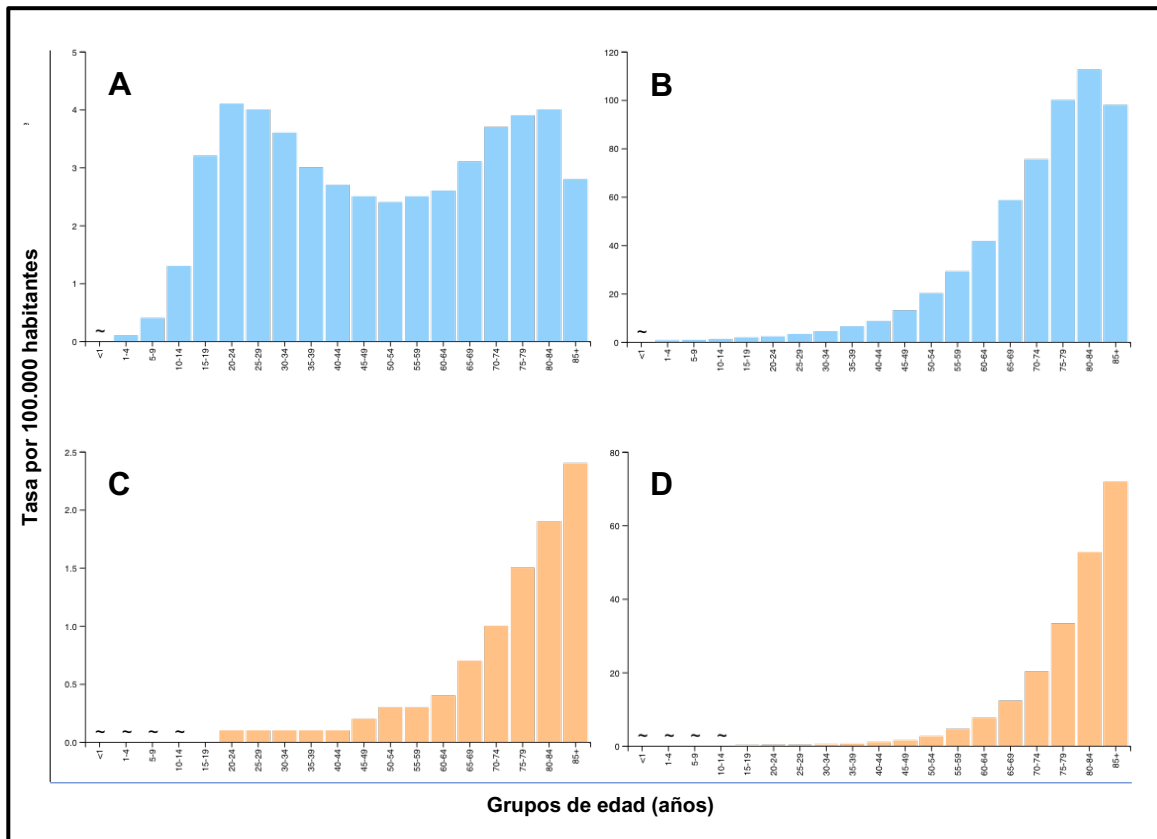


Figura 1. Tasas de incidencia y mortalidad de linfoma Hodgkin y no Hodgkin por grupos de edad ajustadas por raza, etnia y sexo en Estados Unidos durante el periodo 2015-2019. (A) Tasa de incidencia de linfoma Hodgkin. (B) Tasa de incidencia de linfoma no Hodgkin. (C) Tasa de mortalidad de linfoma Hodgkin. (D) Tasa de mortalidad de linfoma no Hodgkin. ~: información omitida por existir menos de 16 casos. Adaptada de: U.S. Cancer Statistics Working Group. *U.S. Cancer Statistics Data Visualizations Tool*, basada en la información facilitada en 2021 (1999-2019): ‘U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention and National Cancer Institute’ (<https://www.cdc.gov/cancer/dataviz>), 2022.

Todo esto pone de manifiesto la imperiosa necesidad de identificar los mecanismos responsables de la identidad de las células tumorales, a fin de poder desentrañar los procesos subyacentes a la carcinogénesis y desarrollar tratamientos más efectivos y personalizados^{24,31–35}.

1.1. Clasificación, historia y clínica del linfoma

Tradicionalmente, y desde el punto de vista histológico, tal y como se comentó en el apartado anterior, el linfoma se clasificaba en linfoma Hodgkin y no Hodgkin a finales del s. XIX. Esta clasificación se basaba en la presencia de un tipo celular B denominado ‘célula de *Reed-Stembert*’ o ‘célula en ojo de búho’, por la particular distribución del doble núcleo de la célula a través del microscopio óptico de campo claro^{2,3,8,10,36}.

Posteriormente, se propusieron otras formas de clasificación de los linfomas. A mediados de los años 70, se incluyó una clasificación, de acuerdo con el pronóstico de la enfermedad dividida en tres grupos: bajo, intermedio y alto grado. Una década más tarde, se actualizó este sistema de clasificación en el que se añadió el grado de malignidad del linfoma (*Revised European-American Lymphoma Classification*)^{2,3,8}:

Actualmente, el pronóstico de cada linfoma diagnosticado se establece de acuerdo con la edad del enfermo, la variedad, la extensión y la terapia potencial que puede aplicarse a cada paciente. En esta línea, desde finales del s.XX los expertos en hematopatología han ido estableciendo diferentes clasificaciones hasta llegar a la nueva clasificación de la Organización Mundial de la Salud en 2008, revisada en 2016, que representa una versión actualizada del sistema REAL, en lo referente a la clasificación de síndromes linfoproliferativos^{2,3,9,37} (**Figura 2**).

- I. Tipos y frecuencia del linfoma no Hodgkin

A) Linfomas de células B.

 1. Linfoma difuso de células B grandes (31%)
 2. Linfoma folicular (22%)
 3. Linfoma de tejido linfoide asociado a mucosas (TLAM) (7,5%)
 4. Linfoma linfocítico pequeño - Leucemia linfocítica crónica (7%)
 5. Linfoma de células del manto (6%)
 6. Linfoma mediastínico (tímico) de células B grandes (2.4%)
 7. Linfoma linfoplasmacítico-Macroglobulinemia de Waldenström (<2%)
 8. Linfoma nodal de células B de la zona marginal (< 2%)
 9. Linfoma esplénico de zona marginal (<1%)
 10. Linfoma extranodal de células B de zona marginal (< 1%)
 11. Linfoma intravascular de células grandes B (< 1%)
 12. Linfoma de efusión primaria (<1%)
 13. Linfoma de Burkitt - Leucemia de Burkitt (2.5%).
 14. Granulomatosis linfomatoide (< 1%)

B) Linfomas de células T y CN (~12%)

 1. Linfoma extranodal T o CN
 2. Linfoma cutáneo de las células T (síndrome de Sézary y micosis fungoide)
 3. Linfoma anaplásico de células grandes
 4. Linfoma angioinmunoblástico de las células T

C) Inmunodeficiencia-Trastornos linfoproliferativos asociados

II. Linfoma de Hodgkin (tipos especialmente designados de linfoma de las células B)

 1. Tipo de predominancia nodular linfocítica
 2. Tipo clásico
 3. Tipo de esclerosis nodular
 4. Tipo de celularidad mixta
 5. Tipo clásico de abundancia de linfocitos
 6. Tipo de disminución de linfocitos

Figura 2. Clasificación y tipos de linfoma según la OMS conforme a la versión actualizada del sistema REAL (*Revised European-American Lymphoma Classification*), para la clasificación de síndromes linfoproliferativos. Se indican los tipos y frecuencia del linfoma no Hodgkin (I): linfomas de células B (A), linfomas de células T y CN (B) e inmunodeficiencias-trastornos linfoproliferativos asociados. Se indican los tipos de linfoma Hodgkin (II). Elaboración propia.

Recientemente, esta clasificación ha sido revisada nuevamente por la OMS. Dicha actualización incluye no solo cambios en la denominación y clasificación de estas patologías, sino que, por primera vez, se han introducido lesiones de tipo tumoral³⁸.

En el caso de los linfomas B, se han incluido un nuevo grupo de lesiones de tipo tumoral con predominancia de células B conformado por cinco entidades: proliferaciones linfoides ricas en células B reactivas que pueden mimetizarse con un linfoma; enfermedad asociada a IgG4; enfermedad de *Castleman* unicéntrica y enfermedad de *Castleman* multicéntrica idiopática. Asimismo, se ha incluido el linfoma/leucemia de células B esplénicas con nucleolos prominentes; el linfoma primario cutáneo de zona marginal y las transformaciones de linfomas B indolentes, entre otros. Dentro de las proliferaciones linfoides y linfomas B, se ha eliminado la leucemia prolinfocítica de células B³⁸.

Además, algunas de estas neoplasias linfoides B se han reclasificado, como es el caso del linfoma de células grandes B asociado a fibrina, considerado previamente un subtipo de linfomas de células grandes B difuso asociado a inflamación crónica³⁸.

En lo referente a los linfomas y proliferaciones linfoides de células T y NK, se ha introducido un nuevo grupo de lesiones de tipo tumoral con predominancia de células T que engloba tres patologías linfoides: la enfermedad de *Kikuchi-Fujimoto*, la proliferación linfoblástica T indolente y el síndrome autoinmune linfoproliferativo. También, se ha incluido un nuevo grupo formado por linfomas de células NK/T positivos para el virus de *Epstein-Barr*. Asimismo, en el grupo de linfomas T primarios cutáneos, se ha incluido un nuevo tipo de linfoma: el linfoma periférico de células T primario cutáneo, NOS. Dentro de este tipo de linfomas T y NK, se ha eliminado el linfoma/leucemia linfoblástico de células NK³⁸.

En el caso de los trastornos linfoproliferativos asociados, se han incluido tres patologías linfomatosas dentro del grupo de tumores esplénicos de estroma vascular: el angioma de células litorales, hamartoma esplénico y la transformación esplénica nodular angiomatoide esclerosante³⁸. Finalmente, en lo que se refiere a la clasificación de los linfomas de Hodgkin, no ha habido ningún cambio respecto a la última publicación de la OMS³⁸.

A finales del 2022, el comité de asesoramiento clínico internacional (ICC) publicó una clasificación internacional consensuada de neoplasias linfoides maduras³⁸. Esta nueva propuesta utiliza nuevas herramientas para redefinir los criterios y algoritmos diagnósticos de un número importante de patologías linfomatosas y la identificación de nuevas entidades tumorales tomando como referencia la información clínica, molecular y genómica generada durante los últimos 5 años. No obstante, se hace hincapié en la necesidad de estandarizar y validar todos estos datos, a fin de poder incorporarlos a la práctica clínico-asistencial³⁹.

En esta clasificación, los grupos principales son: las neoplasias de células B maduras, los linfomas de *Hodgkin* clásicos, las neoplasias de células T y NK maduras, los linfomas cutáneos, las enfermedades linfoproliferativas asociados a inmunodeficiencia y las neoplasias histocíticas y de células dendríticas³⁹.

Dentro de las neoplasias de células B maduras, la nueva clasificación contempla la leucemia linfocítica crónica, el linfoma esplénico de la zona marginal, el linfoma linfoplasmocítico y la gammopatía monoclonal de IgM de significancia indeterminada, las neoplasias de células plasmáticas, los linfomas de la zona marginal, el linfoma folicular, el linfoma de células del manto, los linfomas de células grandes B difusos, los subtipos provisionales de linfoma de células grandes B, las enfermedades linfoproliferativas de células grandes B y agentes virales y los linfomas de células B de alto grado (LCGBD)³⁹.

Entre los linfomas de Hodgkin clásicos, se encuentran las siguientes variedades histológicas: esclerosis nodular, la variante rica en linfocitos, la celularidad mixta y la variante con depleción de linfocitos³⁹. Mientras que en lo referente a las neoplasias de células T y NK maduras, los principales grupos son las neoplasias de células T y NK maduras asociadas al virus de *Epstein-Barr*, las neoplasias de células T y NK extranodales implicadas en el tracto gastrointestinal, el linfoma periférico de células T (NOS), el linfoma de células T_h foliculares y el linfoma anaplásico de células grandes³⁹.

El diagnóstico del linfoma es sistematizado y estructurado y con él se busca determinar el tipo histológico, agresividad y su grado de extensión. Esto resulta esencial para su pronóstico y tratamiento. Los principales procedimientos de diagnóstico tienen como punto de partida el estudio de la historia clínica del paciente, manifestaciones clínicas y exploración física, acompañados de estudios en la sangre (hemograma, nivel de LDH y función hepatorrenal). Sin embargo, la prueba diagnóstica esencial es la biopsia de ganglio linfático (extirpación parcial o total de un ganglio linfático para estudios histológicos y genéticos). Estos estudios deben complementarse con otras exploraciones destinadas a comprobar la extensión del linfoma, es decir, el nivel de afectación de otros órganos. Entre estas se encuentran la biopsia de médula ósea, la punción de médula espinal (biopsia de líquido cefalorraquídeo) y el diagnóstico por imagen complementario (tomografía axial computarizada, TAC; resonancia magnética nuclear, RMN; tomografía por emisión de positrones, PET; radiografía torácica; gammagrafía ósea y ultrasonido abdominal), a fin de valorar regiones corporales extralinfáticas de forma más profusa^{3,4,10,15,18,40-43}.

El tratamiento del linfoma depende del tipo, estadio, edad y estado de salud general del paciente. Las diferentes alternativas terapéuticas pueden emplearse en monoterapia o terapia combinada. Estas son: quimioterapia (tratamiento principal que suele emplearse con radioterapia), radioterapia (tratamiento para la reducción del tamaño tumoral), inmunoterapia (terapia dirigida por anticuerpo monoclonales que suele combinarse con quimio o radioterapia; Rituximab, anti-CD20 para linfoma de células B y *Brentuximab Vedotin*, anti-CD30, combinado con quimioterapia para linfoma Hodgkin), radioinmunoterapia (terapia dirigida con anticuerpos monoclonales marcados radioactivamente; *Ibritumomab Tiuxetan* combinado con itrio-90), bioterapia (*Ibrutinib*, inhibidor de la vía de la tirosina quinasa de *Bruton*/BTK, modificador de la actividad biológica y metabolismo del tumor), trasplante de progenitores hematopoyéticos (reemplazo de la médula ósea del paciente por células madre autólogas o alogénicas, precedido habitualmente por terapia combinada de radio y quimioterapia) y *CAR-T cells* (terapia biológica con linfocitos T con receptor de antígeno quimérico, modificados genéticamente *in vitro*, para identificar y eliminar las células linfomatosas presentes en el organismo)^{15,24,26,44-49}.

2. Linfoma de células grandes B difuso

2.1. Linfomas no Hodgkin (LNH)

Los linfomas no Hodgkin (LNH), también conocidos como ‘linfomas malignos’ para diferenciarlo del linfoma de Hodgkin (LH) consisten en un grupo de enfermedades oncohematológicas caracterizadas por presentar un origen celular linfoide (células B, células T o células NK/*Natural Killer*) en estadios diferentes de maduración^{30,50}. En Occidente, aproximadamente, el 85% de este tipo de linfomas se origina a partir de una célula B madura (Figura 3)^{14,30,51,52}.

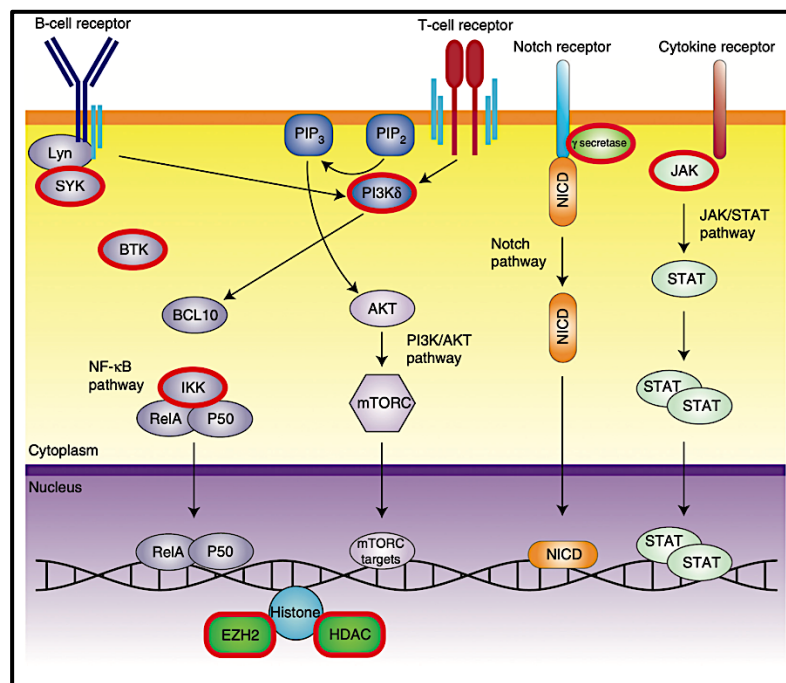


Figura 3. Vías de señalización implicadas en los linfomas no Hodgkin. Las potenciales dianas terapéuticas para las que existen inhibidores aparecen marcadas en rojo. BCR, receptor de célula B; SYK, tirosina quinasa esplénica; BTK, tirosina quinasa de *Bruton*; PI3Kδ, fosfoinositol 3-quinasa delta; NICD, dominio intracelular Notch; JAK, *Janus* quinasa; IKK, IκB quinasa; HDAC, histona desacetilasa. Adaptada de: Shingleton J *et al.* ‘Non-Hodgkin Lymphomas: Malignancies arising from Mature B cells’. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2021; Vol. 11, n° 3, p.1-20²³⁰.

Aunque se desconoce con exactitud la causa de esta patología, sí se sabe que tiene su raíz en una célula linfoide, generalmente madura, cuyo estadio de desarrollo se detiene y comienza a dividirse de forma descontrolada dando lugar a una posterior hipertrofia del órgano del que forma parte^{25,53}.

El hecho de que el tejido linfático, que forma parte de aparato circulatorio, se extienda por todo el organismo conlleva la posibilidad del desarrollo de la enfermedad en, prácticamente, cualquier parte de este, pudiendo diseminarse a otras regiones corporales⁵⁴.

Generalmente, los linfomas se manifiestan a nivel de los ganglios linfáticos. Sin embargo, algunos tipos de LNH comienzan en territorios extranodales como la piel o el sistema nervioso central^{14,15,29}.

En función de la agresividad, los LNH se clasifican en^{9,15,16,27,36}:

1. **Linfomas de bajo grado o indolentes.** Se caracterizan por un comportamiento menos agresivo y por el desarrollo de adenopatías que cursan lenta y paulatinamente, junto con un estado general conservado, a pesar de encontrarse, en su mayoría, extendidos. Los más frecuentes son: el linfoma folicular (segundo tipo más frecuente, por detrás del linfoma de células grandes B difuso), el linfoma de linfocitos pequeños, el linfoma linfoplasmocítico, la macroglobulinemia de Waldenström, el linfoma de la zona marginal (incluidos los linfomas MALT) y el linfoma cutáneo de células T (micosis fungoide y síndrome de Sézary).
2. **Linfomas de alto grado o agresivos.** Se caracterizan por un crecimiento, extensión y diseminación rápidos que desencadenan la aparición de síntomas graves notorios. Los tipos más frecuentes son: el linfoma de células grandes B difuso, LCGBD (constituye el 30-40% de todos los linfomas), el linfoma de células del manto, el linfoma T periférico, el linfoma de Burkitt y el linfoma linfoblástico.

Tabla 1. Indicaciones aprobadas por la FDA para nuevos fármacos en el tratamiento de los linfomas no Hodgkin.

Función	Fármaco	Indicación terapéutica
Inmunomodulador	Lenalidomida	LF, LZM, LCM
Inhibidor de BTK	Ibrutinib	LZM, LCM
	Acalabrutinib	LCM
	Zanubrutinib	LCM
Inhibidor de PI3K	Idelalisib	LF
	Copanlisib	LF
	Duvelisib	LF
Inhibidor del proteasoma	Bortezomib	LCM
Inhibidor de HDAC	Romidepsina	LPCT
	Belinostat	LPCT
	Vorinostat	LCCT
SINE	Selinexor	LCGBD
Inhibidor de EZH2	Tazemetostat	LF

Actualmente, la oferta de quimioterapéuticos e indicaciones disponibles para el tratamiento de los LNH ha aumentado considerablemente, lo que ha mejorado el pronóstico de los pacientes (Tabla 1)^{13,55,56}. El pronóstico de los LNH es muy variable. En el caso del linfoma folicular, la probabilidad de remisión completa es muy baja, pero la tasa de supervivencia global es muy elevada, incluso de 10 años en un número importante de pacientes desde su diagnóstico. En contraposición, se encuentran los linfomas agresivos, como el LCGBD, que suelen responder muy bien al tratamiento y presentan una tasa de remisión completa de la enfermedad del 60-80%. Todo ello pone de relevancia la importancia y necesidad de una mayor comprensión y estudio de esta patología, sobre todo el tipo más frecuente de LNH: los LCGBD^{17,18,27,30,36}.

En los últimos años se han desarrollado modelos animales que modelizan las alteraciones moleculares más frecuentes presentes en los linfomas, lo que ha ayudado a su mejor comprensión y al desarrollo de nuevos fármacos. El principal problema es la elección de la alteración genética que desencadena el proceso cancerígeno, por lo que la mayoría de estos estudios se han dirigido principalmente a las células B del centro germinal, ya diferenciadas. Sin embargo, estos modelos animales no son capaces de mimetizar con exactitud la enfermedad humana ni a nivel biológico ni a nivel genético, por lo que resulta imprescindible hallar y establecer un modelo que reúna las características necesarias para un estudio y análisis más profuso y exhaustivo del LCGBD

2.2. LCGBD: epidemiología, clasificación y etiopatogenia

Los linfomas de células grandes B difuso engloban un conjunto de patologías de carácter hematológico-linfoide que presentan una proliferación de células grandes, núcleos vesiculares con nucleolos visibles, citoplasma basófilo y una tasa proliferativa usualmente elevada⁶⁴⁻⁶⁸. Este tipo de LNH agresivos se desarrolla en las regiones ganglionares, pero puede presentarse también en regiones extraganglionares⁶⁹⁻⁷¹. Los LCGBD tienen una incidencia de 20 casos diagnosticados al año por cada 100.000 habitantes, cuya tasa se incrementa progresivamente con la edad. La edad media de esta enfermedad es de 55 años, aunque puede aparecer en cualquier momento del desarrollo.

Para su clasificación, se ha de tener en cuenta que el linfoma de células grandes B difuso puede aparecer *de novo* (primario) o como una progresión de un linfoma inicialmente menos agresivo (secundario), como el linfoma folicular. Dicha clasificación ha ido actualizándose paulatinamente, hasta alcanzar la que se emplea hoy en día, conforme a lo descrito y recomendado por la OMS^{2,3} y por el Comité de Asesoramiento Clínico (ICC)⁷² reconociéndose un total de seis categorías de LCGBD^{2,3,9,10,37,73}:

1. LCGBD, NOS que representa la forma más común de LNH y LCGBD, por lo que es la categoría sobre la que versa la presente Tesis Doctoral.
2. LCGBD primario del sistema nervioso central.
3. LCGBD primario testicular.
4. LCGBD primario cutáneo de la pierna.
5. LCGBD positivo para el virus de *Epstein-Barr*, NOS.
6. LCGBD asociado a inflamación crónica.

Cada una de estas cuatro categorías incluye, a su vez, subcategorías de acuerdo con su morfología, clínica e histología, lo que evidencia la complejidad en la organización de este tipo de patologías oncohematológicas^{2,3,8-10,37,73-75}. Actualmente, la mayor parte de los casos diagnosticados se corresponde con la categoría de LCGBD no especificado, que es la elegida cuando el paciente presenta linfoma de células grandes B difuso que no se ajusta a ninguno de las categorías definidas. No obstante, esta categoría de LCGBD se subdivide a su vez en diferentes subtipos en función de sus características moleculares, morfológicas, génicas e inmunohistoquímicas⁷⁶⁻⁷⁸.

Desde un punto de vista morfológico, se pueden distinguir tres tipos principalmente: anaplásico, inmunoblástico y centroblástico. Este último, se caracteriza por presentar células medianas o grandes con un núcleo ovalado, redondo o multilobulado (asociado a ubicaciones extraganglionares), además de dos o cuatro nucleolos y un citoplasma basófilo. El LCGBD de tipo inmunoblástico, se caracteriza porque la práctica totalidad de sus células son inmunoblastos con un nucleolo central de gran tamaño y un citoplasma basófilo o anfofilico. Finalmente, la variante anaplásica se caracteriza por presentar células muy grandes ovaladas, redondas o poligonales pleomorfonucleares y poseen cierta similitud con las células de *Reed-Sternberg* del linfoma Hodgkin^{76,79-84}.

El inmunofenotipo de los LCGBD no especificados es característico y destaca la expresión de sIg^{+/-} (inmunoglobulina de superficie), cIg^{+/-} (inmunoglobulina de citoplasma), CD19⁺, CD20⁺, CD22⁺ y CD79a⁺. Junto con estos marcadores de superficie suelen hallarse otros, tales como CD45 y PAX5. Asimismo, pero con menos asiduidad, pueden encontrarse otros marcadores de superficie como CD10, BCL6, IRF4, LMO2, GCET1 o FOXP^{50,85-90}. Además, el estudio del perfil de expresión génica y del transcriptoma, mediante el empleo de técnicas de microarrays o *RNAseq*, posibilita discernir entre diversos tipos moleculares de los linfomas de células grandes B difusos, como es el caso de los linfomas de células grande B difusos de centro germinal (LCGBD-CGB) caracterizados por expresar genes asociados a células B del centro germinal y de los linfomas de células grandes B difusos de células B activadas (LCGBD-ABC) caracterizados por expresar genes asociados a células B activadas de la periferia y a procesos mitogénicos^{75,78,83,84}.

Las aberraciones genéticas más frecuentes, que suponen hasta un 40% entre los casos de los LDGBD no especificado (LCGBD-NOS), son las translocaciones de la región 27 del brazo largo del cromosoma 3 (3q27), que producen el reordenamiento del gen *BCL6*; este gen es responsable del control de la formación del centro germinal y se expresa selectivamente en las células B de centro germinal, actuando como represor transcripcional⁹¹⁻⁹⁷. A nivel molecular, dicha translocación (3q27) impide la represión del gen *BCL6* necesaria para la diferenciación de las células B del centro germinal, lo que desemboca en una alteración genética que provoca la inactivación de *p53*^{92,94,98-100}.

En esta misma línea, el linfoma de células grandes B difuso no especificado suele presentar con frecuencia aberraciones genéticas en otros genes de la familia BCL, como es el caso del gen *BCL2*, alteración asociada al linfoma folicular. La translocación del gen *BCL2* supone el 20% de los casos de LCGBD *de novo* o LCGBD derivados de un linfoma folicular, inicialmente menos agresivo^{95,100,101}.

Otra de las alteraciones genéticas más comunes, que supone el 10% entre los pacientes con linfoma de células grandes B difuso, es el reordenamiento del gen *MYC*. De estos casos diagnosticados, aproximadamente, la quinta parte exhibe, además, la translocación del gen *BCL2* y/o del gen *BCL6*, dando lugar a lo que se conoce como ‘doble *hit*’ o ‘triple *hit*’^{47,61,95,102,103}.

Asimismo, diversas investigaciones han demostrado que el linfoma de células grandes B difuso también puede originarse como resultado de la aparición de mutaciones en genes que modifican y regulan la cromatina. Esta heterogeneidad, desde un punto de vista molecular, se ha observado en cerca del 40% de los casos de linfoma de células grande B difuso de centro germinal y del 18% de linfoma de células grande B difuso de células B activadas, que exhiben deleciones de un único alelo y mutaciones de carácter represor en el gen *CREBBP*^{51,75,83,95,104,105}.

Finalmente, hay que señalar que ambos subtipos de linfoma de células grandes B difuso (centro germinal y células B activadas) presentan con frecuencia alteraciones genéticas asociadas al reconocimiento inmune y presentación antigénica. Concretamente, el 30% de los pacientes diagnosticados posee mutaciones de tipo inactivante, así como deleciones en el gen *B2M*, que codifica para una subunidad del complejo principal de histocompatibilidad I (MHC-I). Esto conlleva la expresión alterada del complejo del antígeno leucocitario humano (HLA-I) implicado en el reconocimiento de las células T citotóxicas CD8⁺^{104,106-109}.

En esta línea, cerca del 20% de los pacientes exhibe alteraciones en el gen *CD58*, involucrado en las respuestas inmunes mediadas por las células NK y T127-129. En conjunto, estos eventos explicarían la evasión inmune y un estado deficiente de inmunovigilancia que favorecería el desarrollo y progreso de la enfermedad. Otras alteraciones de esta tipología son las que tienen lugar en los genes *MHC-II*, *PD-L1* y *PD-L2* asociados al funcionamiento y homeostasis del sistema inmune^{44,48,71,112}.

Así, se evidencia que el linfoma de células grandes B difuso constituye una patología oncohematológica muy heterogénea no solo a nivel genético, sino a nivel clínico y fenotípico (**Figura 4**)¹¹²⁻¹¹⁵. Por tanto, el estudio y análisis de esta heterogeneidad es de vital importancia para una comprensión, diagnóstico y pronóstico más profusos y exhaustivos en una enfermedad que aún, en la actualidad, es responsable de un importante número de defunciones^{40,79,116-118}.

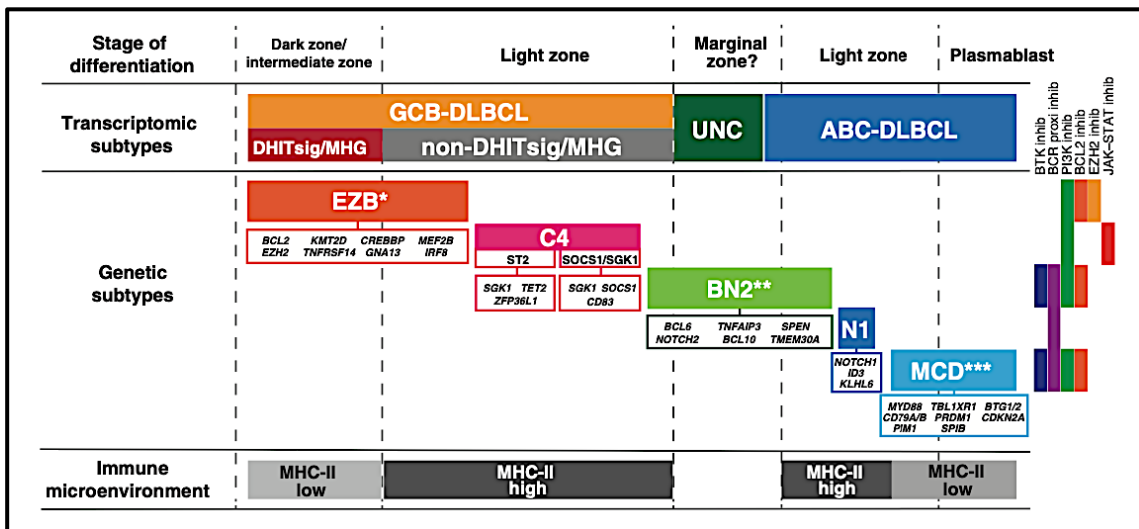


Figura 4. Esquema representativo de la relación entre transcriptómica, taxonomía basada en criterios genéticos y microambiente inmuno-tumoral. Los homólogos de los nuevos grupos taxonómicos aparecen descritos en la parte superior. Las potenciales dianas terapéuticas para los subtipos genéticos están representadas a la derecha. Los principales subtipos moleculares se localizan en la parte central. Adaptada de: Ennishi D *et al.* 'Toward a New Molecular Taxonomy of Diffuse Large B-cell Lymphoma'. *Cancer Discovery* 2020; Vol. 10, n° 9, p. 1267-1281¹⁷².

2.3. LCGBD: célula de origen, clínica y modelos experimentales

Basados en el PEG, se han definido tres tipos principales moleculares de LCGBD: células B del centro germinal, células B plasmablasticas comprometidas al linaje células B y células B nodulares (PMBCL)^{78,83,88,89,106}. De este modo, se establece que la célula responsable del inicio del proceso cancerígeno es una célula diferenciada ya comprometida que define el fenotipo canceroso. Así, la localización anatómica, el inmunofenotipo y la morfología son los responsables de definir la célula origen del cáncer^{1,63,119-121}.

Algunos investigadores han estudiado la posibilidad de que la célula responsable de originar el linfoma de células grandes B difuso sea una célula madre progenitora hematopoyética^{81,122-124}. No obstante, el fenotipo canceroso de la célula madre del cáncer no presentaría ninguna similitud con el resto de los componentes celulares de la masa tumoral principal^{81,122,125}. En este sentido, la interacción molecular de las células tumorales del LCGBD con el microambiente tumoral resulta primordial en el proceso de patogenia tumoral (**Figura 5**)^{76,126-128}.

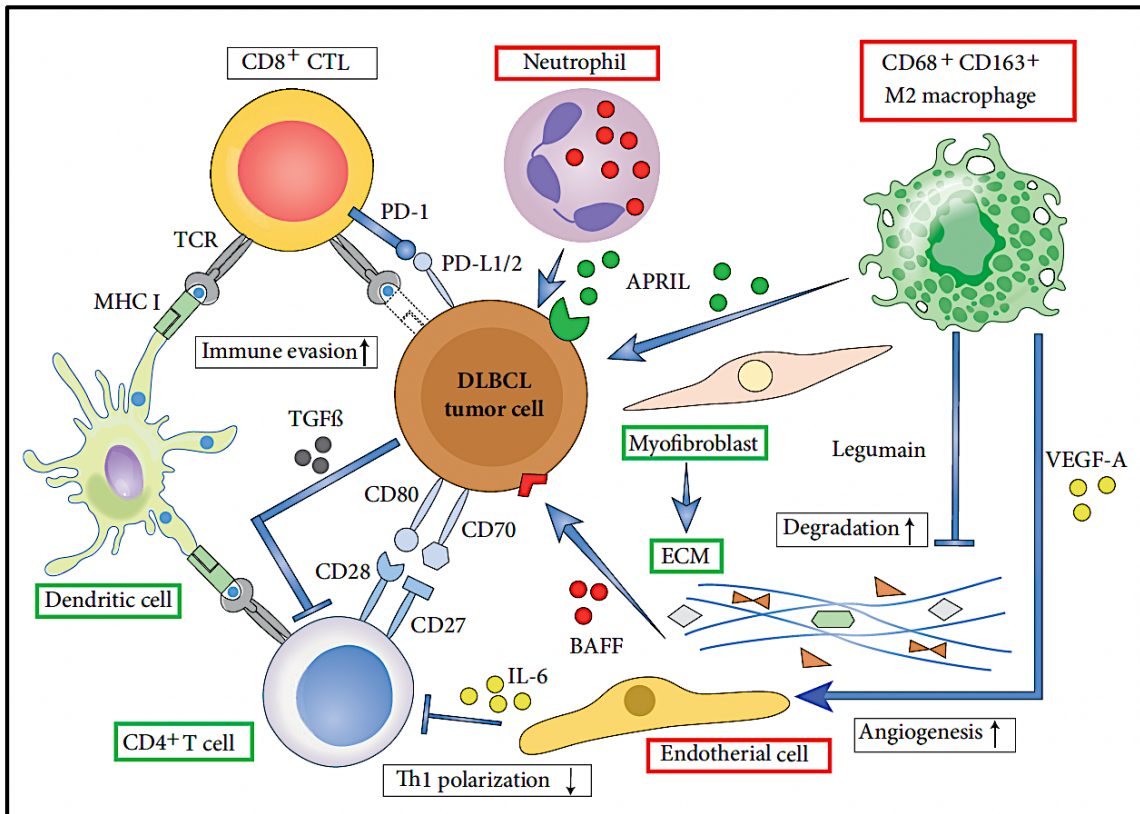


Figura 5. Interacción molecular entre las células tumorales del linfoma de células grandes B difuso y el microambiente tumoral y su implicación en la patogenia tumoral. Representación esquemática que muestra las interacciones moleculares que tienen lugar en el microambiente tumoral y su grado de contribución al pronóstico del LCGBD. Los agentes celulares enmarcados en verde hacen referencia a un buen pronóstico, mientras que los tipos celulares recuadrados en rojo aluden a un mal resultado clínico. LCGBD (linfoma de células grandes B difuso), CTL (células T citotóxicas), PD-1 (muerte celular programa 1), TCR (receptor de células T), PD-L1/2 (ligando de muerte celular programa 1/2), APRIL (ligando de TNF inductor de proliferación), VEGF-A (factor de crecimiento de endotelio vascular A), ECM (matriz extracelular), BAFF (factor activador de células B), IL-6 (interleucina 6), TGF-β (factor de crecimiento transformante β), MHC (complejo principal de histocompatibilidad). Adaptada de: Koya J & Kataoka K. 'More accurate prognostic prediction in diffuse large B-cell lymphoma: beyond cell-of-origin'. *Annals of Oncology* 2018; Vol. 29, n° 12, p. 2284-2285¹²⁶.

Con el fin de comprender el origen y el mantenimiento del proceso tumoral que tiene lugar durante la génesis del linfoma de células grandes B difuso, el uso de modelos experimentales murinos resulta esencial, especialmente en el ámbito de la clínica para la puesta a punto de nuevas aproximaciones terapéuticas^{44,48,79,80,84}. Un modelo experimental óptimo ha de ser capaz de mimetizar y reproducir las características principales del LCGBD: fenotipo, morfología, rasgos moleculares y ser susceptible a los mismos tratamientos empleados en pacientes^{1,129-133}. Hoy en día, se pueden encontrar numerosos modelos experimentales murinos que muestran rasgos muy similares al LCGBD humano, pero ninguno de ellos es capaz de reproducir fielmente la patología humana¹³⁴.

El principal problema es la elección de la alteración genética que desencadena el proceso cancerígeno, dirigida principalmente a las células B del centro germinal, ya diferenciadas, por lo que resulta imprescindible hallar y establecer un modelo que reúna las características necesarias para un estudio y análisis más profuso y exhaustivo del LCGBD (**Figura 6**)^{44,76,131,134,135}.

A continuación, se describen algunos modelos experimentales murinos de los últimos años, según orden descendente de fecha de publicación:

1. **Modelo *E μ -BRD2***. Modelo transgénico con sobreexpresión de la proteína Brd2, especialmente en el bazo. Los animales desarrollan tumores clonales con identidad de linaje B, acompañados de esplenomegalia¹³³.
2. **Líneas celulares humanas LCGBD en ratones inmunocomprometidos**. Empleadas para probar la eficacia de inhibidores de STAT3. No se pueden usar para el estudio de las etapas iniciales del cáncer¹⁰⁸.
3. **Modelo *Cy1-cre/Blimp1^{FF}/IKK2^{castopFL}***. Modelo triple transgénico condicional empleado para estudiar la activación constitutiva de NF- κ B en el desarrollo de linfoma de células grande B difuso de células B activadas por la pérdida de *BLIMP1*¹³⁶.
4. **Modelo *I μ HABCL6***. Modelo *knock-in* de expresión constitutiva de *Bcl6* en linfocitos B diferenciados. Los ratones desarrollan LCGBD con aumento de los centros germinales, para lo cual es necesaria su inmunización semanal⁶⁰.
5. **Modelo *iMycE***. Modelo de simulación de translocación humana t(8;14)(q24;q32). El 60% de estos ratones presentan una proliferación celular B aumentada que da lugar a neoplasias de tipo B; como son el linfoma linfoblástico B, el LCGBD y el plasmacitoma⁶¹.
6. **Modelo *Bad* ^{-/-}**. Modelo *knock-out* para generar cepas murinas con tumores clonales, debido a la ausencia de la proteína proapoptótica Bad⁵⁷.

7. **Modelo H2- Ld -IL6 Tg.** Modelo de sobreexpresión de IL-6, en el que los ratones desarrollan tumores de tipo plasmacitoma en nódulos linfáticos, placas de Peyer y bazo. En el caso del bazo, los linfomas esplénicos desarrollados son de tipo folicular y LCGBD en el 30% de los animales¹³⁷.
8. **Modelo transgénico MCL1.** Modelo murino con sobreexpresión de Mcl1, gen de la familia de Bcl2, en células linfoides, mieloides y progenitores de ambas. La mitad de los linfomas diagnosticados son LCGBD clonal y tumores B¹³⁸.
9. **Modelo pE μ -B29-TCL1.** Modelo de sobreexpresión de Tc11, asociados al desarrollo de linfoma no Hodgkin derivado de centro germinal. Los animales padecieron LCGBD o linfoma de Burkitt de células B maduras¹³⁹.
10. **Modelo Riz1-/-.** Modelo knock-out de Prdm2, regulador de la expresión génica. Los animales desarrollan tumores clonales con características histológicas muy similares a las del LCGBD centroblastico humano¹⁴⁰.

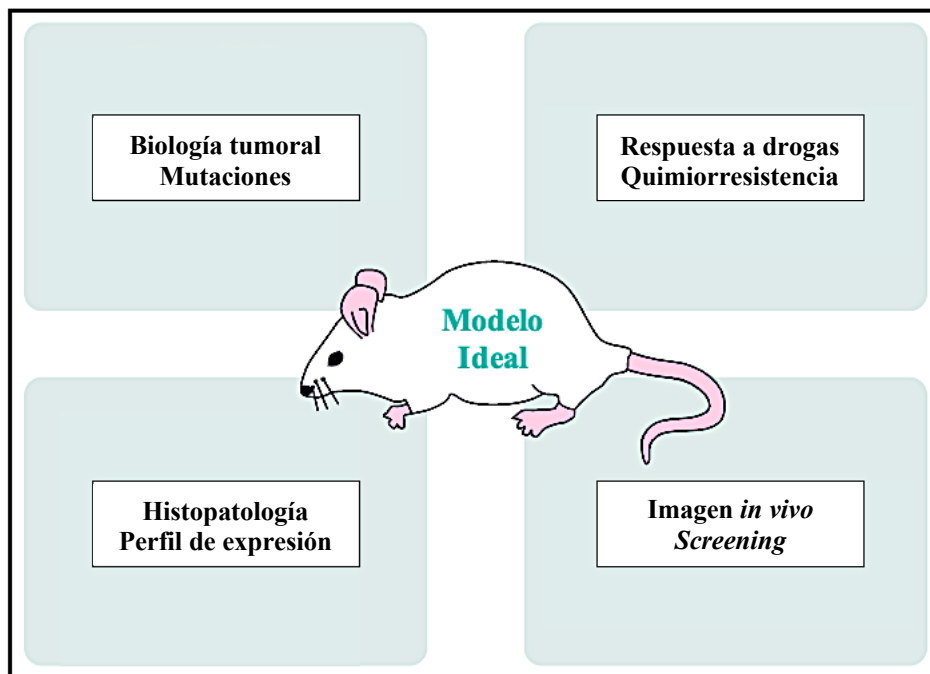


Figura 6. Modelo ideal de ratón transgénico para el estudio del LCGBD. Criterios y características del modelo experimental murino modificado genéticamente con rasgos óptimos para su empleo en la investigación oncológica humana, por su capacidad de mimetizar la patología tumoral. Adaptada de: Cheon D & Orsulic S. 'Mouse Models of Cancer'. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 2011; Vol. 6, p. 95-119¹²⁹.

3. El gen del linfoma asociado a centro germinal humano (*HGAL*)

3.1. *HGAL*: origen y expresión

La búsqueda continua de dianas para el abordaje terapéutico del linfoma de células grandes B difuso derivó en la identificación y posterior clonación de un gen al que se denominó *HGAL* (*human germinal center-associated lymphoma*), también conocido como *GCET2* (*germinal-center expressed transcript*)^{43,141–143}.

Para llegar a esta afirmación, se analizaron muestras de ARN obtenidas de biopsias de pacientes con LCGBD, a las que se les sometió a diferentes pruebas de expresión génica¹⁴⁴, que llevaron a la identificación de más de 200 genes que presentaban una expresión correlacionada con el pronóstico de estos pacientes. De entre todos estos genes, *HGAL* era el que tenía una expresión más relacionada con la supervivencia de estos pacientes. De hecho, aquellos casos de LCGBD que expresaban *HGAL* con mayor intensidad fueron los que presentaban mejores datos de supervivencia¹⁴⁴.

Con posterioridad, *HGAL* y su expresión han servido como rasgo molecular y fenotípico para la categorización e identificación de un subgrupo de pacientes con linfoma de Hodgkin, en los que existe una clara asociación positiva entre la expresión de dicho gen y la supervivencia global y la supervivencia libre de eventos (**Figura 7**)^{11,145}. Para su identificación, se empleó un *microarray*, según el cual la expresión de *HGAL* era elevada en linfocitos del centro germinal, intermedia en el timo y el bazo y muy reducida en los linfocitos B periféricos y pulmones; mientras que el resto de los tejidos y órganos presentan trazas de expresión de este gen¹⁴⁴.

En lo que respecta a los experimentos llevados a cabo en las distintas líneas celulares, *HGAL* se expresa en aquellas que proceden de linfoma no Hodgkin, mientras que no lo hacen en líneas celulares provenientes de linaje T (*Jurkat*) o líneas no linfoides¹⁴⁴. En los linfomas foliculares (LF) *HGAL* muestra una expresión elevada, mientras que es variable en los LCGBD¹⁴⁴.

Sin embargo, la expresión de *HGAL* es débil y casi imperceptible en el caso de otras patologías hematológicas, como es el caso de la leucemia mieloide crónica o la

leucemia linfoblástica T (**Figura 7**)¹⁴⁴. Posteriormente, se generó un anticuerpo monoclonal específico frente a *HGAL*, lo que permitió analizar de forma profusa y exhaustiva la expresión del gen de interés en el citoplasma de los linfocitos B del centro germinal en muestras de amígdalas humanas¹⁴⁴. Todo ello facilitó estudiar la expresión de *HGAL* en diversos tipos de linfoma de interés, a saber: el linfoma de Burkitt, el linfoma folicular, el linfoma mediastínico y los LCGBD, todos ellos procesos linfomatosos derivados del centro germinal (**Figura 7**)¹⁴⁴.

Por consiguiente, la expresión de *HGAL* se produce en los linfomas de células B derivados del centro germinal y en el LH¹⁴⁵.

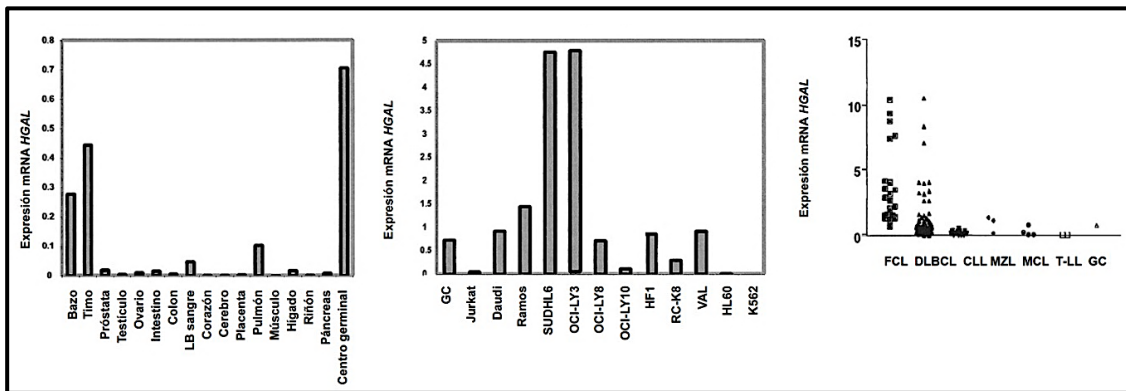


Figura 7. Expresión de *HGAL* medida por RT-PCR en tejidos, líneas celulares y neoplasias hematológicas. *HGAL* se encuentra expresado principalmente en el centro germinal y las líneas celulares derivadas de este. FCL (linfoma folicular), DLBCL (linfoma de células grandes B difuso), CLL (leucemia linfocítica crónica), MZL (linfoma nodal de zona marginal), MCL (linfoma de manto); T-LL (linfoma linfoblástico T), GC (centro germinal). La expresión de *HGAL*, aquí representada, es relativa a la expresión de *HGAL* normalizada con respecto a *GAPDH* en relación con la ratio *HGAL/GAPDH* en la línea celular *Raji*. Adaptada de: Lossos I *et al.* 'HGAL is a novel interleukin-4-inducible gene that strongly predicts survival in diffuse large B-cell lymphoma'. *Blood* 2003; 101: 433-440¹⁴⁴.

3.2. Estructura, biología y funcionalidad de *HGAL*

HGAL es un gen que codifica para la proteína homónima y se encuentra localizado en la región 13 del brazo largo del cromosoma 3 (3q13)^{142,146}. Dicha proteína consiste en un polipéptido de 178 aminoácidos, que comparte un 62% de similitud y un 51% de identidad con la proteína M-17, característica del centro germinal murino^{118,147}.

La proteína *HGAL* posee un perfil lipófilo con ausencia de dominio transmembrana, así como secuencia de localización nuclear.

Asimismo, esta proteína posee un motivo ITAM (*modified immunoreceptor tyrosine-based activation motif*), dentro del cual se hallan dos de los seis residuos de tirosina que presenta HGAL; estos son susceptibles de fosforilación, lo que permite la interacción interna de puentes disulfuro^{148–151}. Además, el extremo amino terminal es susceptible de sufrir miristilación y palmitoilación, lo que posibilita la unión de HGAL a la membrana mediante anclaje. Para finalizar, la proteína HGAL posee un dominio PDZ en su extremo carboxilo terminal, de gran utilidad en las interacciones proteína-proteína^{144,151–153}.

En lo que se refiere a las funciones y mecánica de la proteína HGAL, se han desarrollado numerosas investigaciones a fin de vislumbrar y desentrañar el papel que juega *HGAL* en el proceso linfomatoso, a todos los niveles^{141,150,154}. Entre otros datos interesantes, el diseño y estudio de un modelo *knock-out* para *M-17*, homólogo murino de *HGAL*, demostró la expresión de esta proteína es prescindible para la formación, desarrollo y función del centro germinal. Sin embargo, los animales *M-17-KO* exhibían placas de *Peyer* considerablemente más pequeñas⁶². Durante los últimos años, *Lossos*, junto a diversos colaboradores, ha estado investigando sobre el papel de HGAL a nivel molecular, celular, fisiológico y biológico. Uno de sus estudios más destacados reveló que HGAL es inducible por la acción de IL-4¹⁴⁴. Esta misma inducción es la responsable de la activación de transductores de señales y activadores de STAT6, fomentando la proliferación celular¹⁴⁴. En el caso opuesto se encuentra el subtipo molecular de linfoma de células grande B difuso de células B activadas, en el cual la interleucina activa AKT, lo que provoca la proliferación celular por detención del ciclo, desembocando en la imposibilidad de inducir la expresión de los genes diana de la IL-4^{144,147,155,156}. A nivel molecular y celular, HGAL constituye una proteína citoplasmática que bien podría actuar como proteína de tipo adaptador. Esta creencia se apoya en el hecho de que, tras su estimulación, se desencadena la fosforilación de sus tirosinas y el posterior reclutamiento de proteínas del citosol hacia la membrana plasmática, con el fin de conformar un complejo de señalización^{146,157}.

En este mismo sentido, se ha demostrado que la proteína HGAL es capaz de unirse a la actina y miosina II del citoesqueleto a través de su extremo amino terminal, lo que la involucra en el proceso de migración celular^{143,148}.

Así, se sabe que la IL-6 induce la fosforilación de la proteína HGAL a través de la proteína LYN localizada en su residuo de tirosina del extremo carboxilo terminal^{137,141}. Esto deriva en la reubicación de HGAL en los podosomas, aumentando así la interacción de esta con la miosina I, lo que conlleva la inhibición de la migración celular¹⁴¹.

Estudios adicionales han corroborado y puesto de manifiesto la implicación de HGAL en el proceso de migración celular, profundizando en ello desde un punto de vista biológico y fisiológico. Más específicamente, se ha demostrado que HGAL merma la motilidad celular de los linfocitos B del centro germinal, esto es: HGAL activa la señalización de la proteína RhoA, a través de su interacción con GEF y LARG, responsables de la formación de GTP y la consecuente activación de RhoA; esto supone la disminución de la migración celular¹⁵⁶. De este modo, HGAL promueve la unión de la miosina a la F-actina por interacción directa, impidiendo la translocación de la actina por la miosina¹⁴³.

Todo ello, por tanto, pone en valor el papel de *HGAL* a nivel celular no solo como interventor en el mantenimiento del centro germinal, sino como piedra angular del confinamiento de las células B en el microambiente del centro germinal^{1,148,150}. De forma sincrónica, se ha hecho patente la implicación de *BLIMP1*, responsable del proceso de diferenciación de los linfocitos B a células plasmáticas, en la inhibición de la expresión de *HGAL*. Dicha inhibición, se sabe que ocurre por la interacción directa de *BLIMP1* con el promotor de *HGAL*, lo que explicaría la ausencia de expresión de este último en tumores linfoides de tipo centro germinal B (**Figura 8**)^{90,136,158,159}.

La acción ejercida por HGAL sobre la movilidad y migración celular de los linfocitos B es debida, en parte, a la regulación del miR-155 un micro ARN implicado en procesos de linfomagénesis y respuesta inmunes. Su intervención consiste en su unión al extremo 3'UTR (región no traducida), produciendo la disminución de la expresión de HGAL (**Figura 8**)¹⁶⁰.

Por todo lo anteriormente expuesto, se puede afirmar que *HGAL* parece jugar un papel esencial en la migración de los linfocitos B del centro germinal, manteniendo a los mismos recluidos por la inhibición de su capacidad de motilidad (**Figura 8**)¹⁵⁴.

No obstante, estos hallazgos no son capaces de explicar la importancia a nivel biológico de la expresión de *HGAL* en el centro germinal^{144,146,150}.

Actualmente, no se conoce con exactitud si *HGAL* podría constituir un oncogén o un protooncogén o si juega un papel relevante en la patogenia del linfoma de células grandes B difuso a través de su ganancia o pérdida de expresión, en gran parte, porque no hay modelos experimentales capaces de mimetizar y de reproducir con precisión la función de la proteína humana HGAL^{142,146,148}.

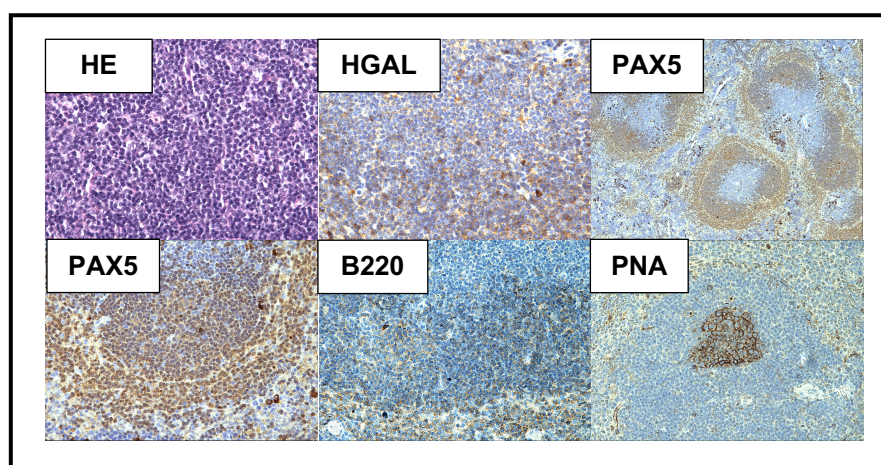


Figura 8. Expresión de HGAL durante la formación del centro germinal. La identificación de marcadores de superficie, mediante el uso de distintas tinciones (HE, HGAL, PAX5, B220 y PNA), revela la localización y distribución de las células B del centro germinal. Elaboración propia.

3.3. HGAL y etiopatogenia del LCGBD

Las células B se originan en la médula ósea por la diferenciación de células madre hematopoyéticas. Durante su ontogenia temprana se producen reordenamientos en los genes que codifican para las inmunoglobulinas, a saber: reordenamientos de los segmentos VH, DH y JH de la cadena pesada y de los segmentos VL-JL de la cadena ligera^{122,161,162}. Estos posibilitan la generación de un notable repertorio de células B y, por ende, la formación de anticuerpos capaces de reconocer más de 1 millón de antígenos diferentes¹⁶¹⁻¹⁶³. Las células madre hematopoyéticas, previamente mencionadas, son las responsables de la formación de progenitores multipotentes (MPPs), que se diferencian a progenitores mieloides comunes (CMPs) o progenitores linfoides tempranos (ELPs)^{161,162,164}.

Dichos progenitores multipotentes comienzan a expresar *RAG1* y *RAG2*, genes responsables del reordenamiento de genes que darán lugar a las inmunoglobulinas de las células B^{161,162,164}.

Estos ELPs se diferencian a progenitores linfoides comunes (CLPs), que posteriormente empiezan a expresar el marcador de superficie característico de la célula B: B220. Los linfocitos en estadio pro-B (CLP-2) son los que sufren el reordenamiento de sus genes VDJ de la cadena pesada y expresan en su superficie el marcador CD19, lo que da lugar al estadio de desarrollo pre-BI. El posterior reordenamiento de los genes involucrados en la formación de la región variable da lugar a la diferenciación de estos linfocitos a pre-BII grandes. En este momento, las células B dejan de expresar los genes *RAG1* y *RAG2* y se origina el receptor pre-B (pre-BCR), momento crítico en el control de desarrollo linfoide B. En este estadio de desarrollo destaca la expansión clonal junto con la reexpresión de los genes *RAG*, con el consiguiente reordenamiento de los genes implicados en la cadena ligera, lo que deriva en la formación de células pre-BII pequeñas (**Figura 9**)^{150,161,162}.

La expresión del receptor de células B (BCR) en la superficie marca el estadio de diferenciación del linfocito B inmaduro, en el que se analiza su autorreactividad. De este modo, los linfocitos B que resultan autorreactivos pueden ser rescatados en un proceso secundario de reordenamiento o eliminados/inactivados por anergia o apoptosis^{162,165-167}. Las células B inmaduras que expresan IgM en su superficie dejan la médula ósea y viajan hasta el bazo^{165,167}. El proceso de diferenciación del linaje B está estrictamente regulado, especialmente en los primeros estadios de desarrollo, por un conjunto de factores de transcripción que intervienen de forma secuencial^{161,165}.

En el caso del estadio de desarrollo MPP, *PU-1* es esencial, pues según su grado de expresión los progenitores multipotentes se diferencian al linaje mieloide o linfoide. De la misma forma, Ikaros, Aiolos y Helios son fundamentales para determinar el destino durante las primeras etapas del proceso hematopoyético, diferenciación a ELPs, a través de la remodelación de la cromatina^{161,162,168}. Por otro lado, los factores de transcripción E2A, EBF y PAX5, que cooperan entre ellos, poseen un rol crucial en la diferenciación de CLPs a células pro-B^{162,169}.

Otros factores de transcripción, tales como SOX499, LEF1100, IRF4, IRF8¹⁰⁷ intervienen también en los primeros pasos del desarrollo de las células B; mientras que otros como Aiolos y OBF1, no solo ejercen su actividad durante los primeros estadios de desarrollo, sino que son imprescindibles para el completo funcionamiento de las células B maduras en la periferia (**Figura 9**)^{122,162,169}.

Las células B, una vez que abandonan la médula ósea y llegan hasta el bazo, continúan su proceso de diferenciación. Inicialmente, pasan por estadios de desarrollo transicionales (T1 y T2), para posteriormente, dar lugar a linfocitos B maduros, tras sufrir una selección negativa. De entre todos los linfocitos B transicionales, tan solo unos pocos migran hacia la zona marginal del bazo donde se transforman en células B de la zona marginal. Sin embargo, la gran mayoría de las células B transicionales (T2) dan lugar a células B foliculares, que circulan libremente por los folículos esplénicos y los nódulos linfáticos, y pueden regresar a la medula ósea, hasta que se produce su inmunosenescencia o reconocen a un antígeno y maduran^{161,165,167}.

En el bazo, si las células B reconocen a un antígeno y poseen la cooperación de células T, se desarrolla un área especializada folicular en la que las células B proliferan y se desencadena el proceso de cambio de isotipo de inmunoglobulina, así como la maduración de la afinidad: el centro germinal^{165,170}. La formación de estas estructuras tiene lugar en los folículos esplénicos, los nódulos linfáticos, las placas de Peyer y las amígdalas. Para ello, las células B inmaduras migran hacia la zona rica en células T de los tejidos linfoides donde son activados por su interacción con células T CD4⁺ y células presentadoras de antígenos (APC). Dicha interacción, se da por la presencia de receptores en la superficie de las células B, como TNF y por la presencia de ligandos expresados por células T (CD154, ligando de TNF) o APC^{107,167,170}. Una vez activadas, las células B son capaces de diferenciarse a células secretoras de anticuerpos, células plasmáticas, o a precursores B de centro germinal, por su migración hacia el folículo primario donde hay células B recirculantes IgM⁺ IgD⁺ y células dendríticas foliculares. En esta región, las células B proliferan y apartan a las células B recirculantes hacia la zona del manto, alrededor del centro germinal, lo que genera una estructura secundaria llamada: folículo secundario^{161,165,167}.

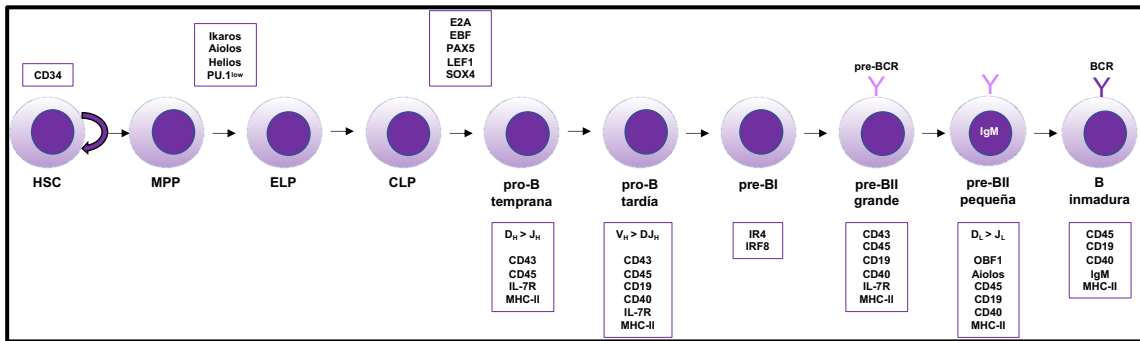


Figura 9. Representación esquemática de la ontogenia del linaje B en la médula ósea. Las células madre hematopoyéticas (HSC) dan lugar a los progenitores multipotentes (MPPs). Estos dan lugar a los progenitores linfoides tempranos (ELPs) y a los progenitores linfoides comunes (CLPs). Estos últimos originan las células pro-B que expresan B220 y el posterior reordenamiento de sus segmentos D y J de la cadena pesada y la expresión de CD19 marca la formación de células pre-BI. Estas reordenan los segmentos de la región variable de la cadena pesada para dar lugar a las células pre-BII grandes que expresan el pre-BCR. El reordenamiento de los segmentos de la cadena ligera delimita el estadio de desarrollo de células pre-BII pequeñas. Finalmente, la presencia del BCR en la superficie celular marca el desarrollo del linfocito B inmaduro. Se presentan algunos de los factores de transcripción más importantes en el desarrollo linfocito B, en la parte superior e inferior. Elaboración propia.

La estructura del centro germinal consiste en una zona oscura conformada por células B recirculantes (centroblastos) y una zona clara, formada por células B más pequeñas (centrocitos) que no proliferan. En torno a estos últimos, se organizan y localizan las células dendríticas, las células T y los macrófagos (**Figura 10**)^{170,171}. Durante el proceso proliferativo, los centroblastos sufren un fenómeno conocido como hipermutación somática, responsable de la introducción de modificaciones de los segmentos génicos VDJ que codifican para la región variable que originan las inmunoglobulinas (**Figura 10**)¹⁷². Para ello, se precisa de la intervención de AID, que permite la introducción de mutaciones somáticas por medio de la desaminación de citosinas en el ADN. Al mismo tiempo, la actividad de AID está regulada por *E1*, *PAX5*, *IRF8*, *RPA* y *PKA*^{21,43,107,173}.

Durante su desarrollo, los centroblastos presentan elevadas tasas de proliferación y mutación, por lo que se seleccionan las células B con mayor afinidad y especificidad por el antígeno y el resto de las células B se eliminan por apoptosis (**Figura 10**)^{170,171}. Tras su proliferación, los centroblastos se diferencian a centrocitos y pasan a ocupar la zona clara del centro germinal, donde el receptor modificado se selecciona para mejorar su unión al antígeno. De nuevo, todos aquellos centrocitos que no presentan un receptor adecuado son eliminados por apoptosis; mientras que aquellos que poseen un receptor favorable sufren un proceso irreversible de recombinación para el cambio de clase de inmunoglobulina, mediado por *AID*, *CD40-CD154*, *ICOS*, *TACI* y *BAFFR*^{150,165,174,175}.

Los centrocitios seleccionados durante el proceso de proliferación, maduran y diferenciación dan lugar a células B de memoria o células plasmáticas (**Figura 10**). El regulador del centro germinal, por antonomasia, es *BCL6*, que se encuentra expresado en centroblastos y centrocitios^{92,95,98,162}. Este regulador se encarga de inhibir aquellos genes implicados en la activación de células B, como *CD69*, *CD80* o *STAT1*, por la represión de genes involucrados en la regulación a la baja del ciclo celular. Esto supone la inhibición de la respuesta al estrés genotóxico, así como el bloqueo de la diferenciación a célula plasmática y célula B de memoria^{165,167,176,177}.

Se sabe que la inhibición de la expresión de *PAX5* constituye el primer paso para la diferenciación a célula plasmática. Asimismo, durante el estadio de desarrollo de plasmablasto, tanto *BLIMP1* como *IRF4* aumentan su grado de expresión. *BLIMP1*, a su vez, inhibe la expresión de *BCL6* y *PAX5*. También, hay que destacar el papel de *XBPA1*, factor de transcripción, responsable del fenotipo secretor de las células plasmáticas (**Figura 10**)^{93,107,136,159,176}.

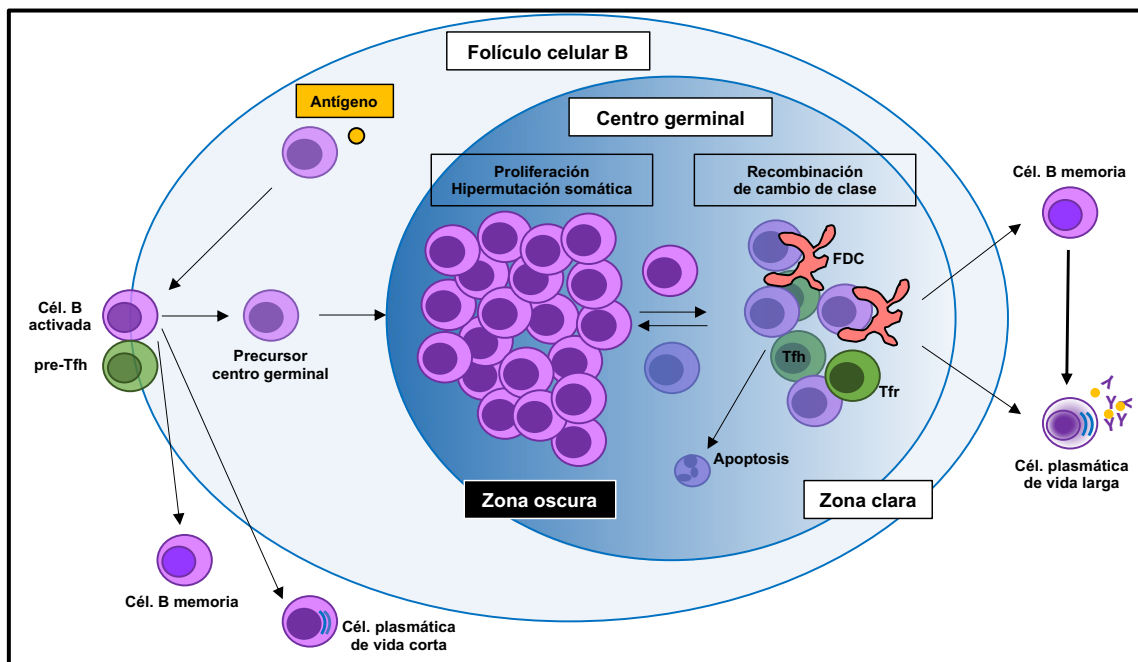


Figura 10. Formación del centro germinal. Tras la estimulación del antígeno dependiente de las células T, las células B específicas del antígeno se activan y migran hacia el borde T-B y/o las zonas interfoliculares, donde interactúan con células precursoras de linfocitos Th foliculares (pre-Tfh). A continuación, las células B activadas pueden seguir tres destinos: diferenciarse en células plasmáticas extrafoliculares de vida corta que secretan anticuerpos de baja afinidad, precursores de centro germinal o células B de memoria temprana recirculantes. Los precursores de centro germinal se mueven hacia el centro de los folículos de las células B y forman centros germinales incipientes. El centro germinal maduro se polariza en una zona oscura y una zona clara. Las células B de la zona oscura sufren una expansión clonal masiva e hipermutación somática y migran hacia la zona clara. Con ayuda de las células T (células Tfh y células T foliculares reguladoras, Tfr) y células dendríticas foliculares (FDC), las células B de la zona clara pueden someterse al proceso de recombinación de cambio de clase y se seleccionan positivamente en función de su afinidad. Los clones de alta afinidad abandonan el centro germinal y se diferencian terminalmente en células B de memoria y células plasmáticas de vida larga. Elaboración propia.

El BCR o receptor de células B se encuentra constituido por las cadenas ligeras (IgL) y pesadas (IgH) de las inmunoglobulinas localizadas en la membrana plasmática, en asociación con los heterodímeros CD79a/CD79b¹⁷⁸, que poseen motivos tipo ITAM en su estructura. Su activación se origina tras la interacción del antígeno con el anticuerpo de superficie, que provoca la agregación del receptor. Posteriormente, las subunidades a/b se encargan de la transducción de las señales hacia el interior celular, a través de la fosforilación en cascada de las tirosinas (presentes en sus motivos ITAM) por las quinasas de la familia SRC, a saber: LYN, FYN y BLK (**Figura 11**)^{150,175,178}.

Más específicamente, la tirosina quinasa LYN se acerca a los motivos tipo ITAM presentes en las colas citoplasmáticas de los heterodímeros CD79a/CD79b y fosforila sus residuos de tirosina. Esto desemboca en la unión de la proteína SYK a los motivos ITAM, concretamente a los dominios SH2 de los mismos, lo que conlleva la fosforilación de SYK y, por ende, su activación (**Figura 11**)^{150,178,179}.

Una vez activada, la proteína SYK capta un complejo conector de células B (CIN85 y BLNK) que da lugar a la fosforilación y activación de la tirosina quinasa BTK y la fosfolipasa C γ 2 (PLC γ 2). Esta última activa una nueva vía que desencadena la entrada de calcio al interior celular y la activación de la proteína quinasa C (PKC). Estos dos eventos, a su vez, inducen la fosforilación y consecuente activación de CARD11, proteína adaptadora responsable de la coordinación de un complejo que activa la vía de NF- κ B (**Figura 11**)^{174,180}.

A estos actores de la activación del complejo BCR, se une la familia de factores de intercambio de nucleótidos de guanina VAV que, a través de la activación de RAC1, intervienen en la señalización del linfocito B y regulan los cambios en el citoesqueleto (**Figura 11**)^{165,181,182}.

Asimismo, VAV es captado en el correceptor CD19, tras la fosforilación en cascada de tirosina quinasas por LYN. Su función es activar la serina/treonina quinasa AKT. Esta última, a su vez, es capaz de potenciar la activación de NFAT contrarrestando los efectos de tipo inhibitorio de la GSK3 sobre NFAT (**Figura 11**)^{161,181,182}.

Todo ello tiene como resultado la activación del complejo del BCR, la vía RAS, PI3K, MAPK y factores de transcripción NFAT y NF- κ B. Esto induce modificaciones del metabolismo, expresión génica, así como la reorganización del citoesqueleto. Las consecuencias de este fenómeno incluyen procesos de tolerancia, apoptosis, proliferación, diferenciación, memoria y supervivencia^{165,183,184}.

El grado, intensidad y magnitud de esta respuesta depende del estadio de maduración de la célula B, la naturaleza antigénica, así como la duración del proceso de señalización. También, se encuentra regulado por la acción de otros receptores de señalización, como es el caso de BAFF-R o CD40. En esta línea, se encuentran otras proteínas que juegan un papel indirecto en la activación del BCR, a través de la modulación de diferentes elementos de la vía: CD19, CD45, CD22...^{167,172}

Del mismo modo, esta vía de señalización del receptor de células B presenta una regulación negativa. Algunos de los actores principales de esta inhibición (Fc γ RIIB1, CD22 y PIR-B) actúan por el reclutamiento de las proteínas tirosina fosfatasas SHP1 y SHIP en los motivos ITIM (motivos inhibidores del inmunorreceptor basados en tirosina)^{162,165,175,179}.

En el caso de SHP-1, su acción consiste en impedir la acción de LYN sobre SYK y BTK por desfosforilación de ambas, así como impedir el reclutamiento de la fosfolipasa C γ 2. En lo que respecta a CD22, este correceptor regula la vía del BCR por activación e inhibición. Por un lado, la retención de la proteína GRB2 en el citoplasma promueve la activación de la vía MAPK. Por otro lado, la retención de SHP1 en los ITIMs bloquea la señalización del complejo BCR^{149,150,175}.

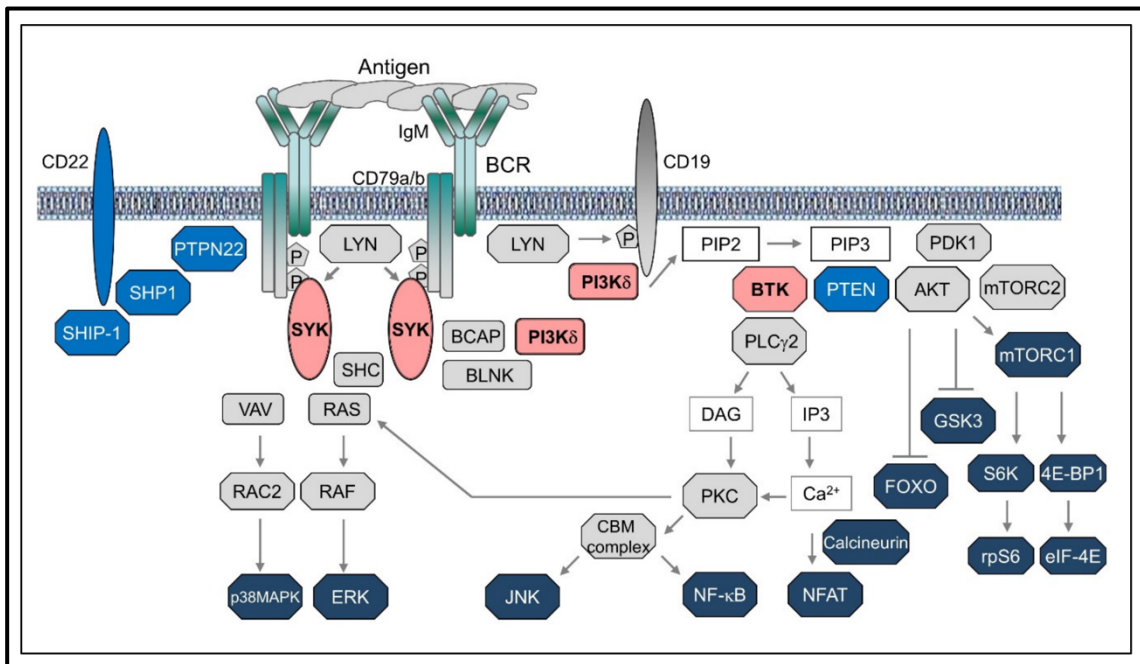


Figura 11. Esquema representativo de la señalización del complejo del receptor de células B. La activación del BCR comienza con la interacción anticuerpo-antígeno. Tras la agregación del receptor, la proteína LYN fosforila los motivos ITAM del complejo CD79a/CD79b, uniéndose la proteína SYK a los residuos SH2 con su posterior fosforilación y activación. A su vez, SYK recluta a BLNK, lo que provoca la fosforilación y activación de BTK y PLC γ 2. Esto genera el aumento de calcio intracelular y la activación de PKC. El resultado de este proceso de señalización del complejo BCR es la activación de las vías RAS, PI3K, MAPK y factores de transcripción NFAT y NF- κ B. Adaptada de: Efremov D *et al.* 'Mechanisms of B Cell Receptor Activation and Responses to B Cell Receptor Inhibitors in B Cell Malignancies'. *Cancers* 2020; Vol. 12, p. 1396¹⁶⁷.

Hipótesis

Hipótesis

Los linfomas de células grandes B difusos (LCGBD) son la forma más frecuente de linfoma no Hodgkin, y constituyen entidades fenotípica y genéticamente heterogéneas. Con un régimen de tratamiento estándar, basado en el uso de poliquimioterapia Combinada con *Rituximab*, son tratables y curables en el 50-70% de los pacientes. Sin embargo, estos tratamientos no logran curar al resto de enfermos, bien porque no producen respuestas completas o bien porque se producen recidivas o recaídas. Por ello, esclarecer la biología de los LCGBD resulta esencial para desarrollar nuevos enfoques terapéuticos, que mejoren la supervivencia de los pacientes con LCGBD.

No obstante, hay que destacar que, en la actualidad, se han incorporado un número importante de a los tratamientos disponibles para estos pacientes. Algunos consisten en nuevos anticuerpos monoclonales frente a potenciales dianas terapéuticas, otros presentan una actividad inmunomoduladora y otros llevan a cabo una acción inhibitoria sobre puntos de interés en las vías de señalización. A ello, se suma el gran desarrollo e impacto de los ensayos clínicos, con los que se está encaminando la práctica clínica hacia la medicina personalizada, ámbito en el que destaca la terapia génica mediada por las células CAR-T.

Dentro de los procesos que contribuyen a la linfomagénesis se ha demostrado que la señalización y la regulación de la movilidad del receptor de células B (BCR) es un proceso clave en el desarrollo de los LCGBD. Entre estos procesos cabe citar la proteína HGAL, una proteína adaptadora específica de células B que controla el BCR y se expresa, en células normales sanas, en las células B del centro germinal. Las investigaciones desarrolladas hasta ahora han puesto de manifiesto la importancia de esta proteína en la localización y distribución de las células B del centro germinal y en su formación, pues HGAL es responsable de retener a los linfocitos B e impedir su migración fuera de esta estructura linfoide secundaria. Algunos resultados previos del grupo de investigación han demostrado que la expresión de *HGAL* en los LCGBD se asocia con una mayor supervivencia^{11,144,145,185}.

Teniendo en cuenta que *HGAL* interviene en la regulación de dos procesos biológicos críticos implicados en la patogenia de los LCGBD (señalización del BCR y migración de células B) y se expresa constitutivamente en un número importante de tumores y linfomas, me he planteado la hipótesis de que *HGAL* pueda contribuir a la patogenia de los LCGBD. Para demostrar esta hipótesis sería necesario la generación de un modelo murino en el que se pueda sobreexpresar *HGAL* y determinar si esta proteína puede producir LCGBD en estos modelos condicionados, pudiendo servir como base biológica de su implicación en la génesis de los LCGBD.

Con ello, se pretende dilucidar si la sobreexpresión de *HGAL* está involucrada directa o indirectamente en el proceso linfomatoso. En caso afirmativo, se indagaría cuáles son las consecuencias a nivel de supervivencia, histología y genética en el modelo experimental propuesto. Finalmente, en caso de cumplirse la hipótesis propuesta, estos resultados podrían suponer potencialmente la antesala de desarrollo de nuevas terapias que tengan como diana terapéutica a *HGAL*.

Objetivos

Objetivos

1. Estudiar, analizar y caracterizar la identidad molecular de los linfomas de células grandes B difusos asociados a la sobreexpresión de *HGAL* en un modelo murino capaz de reproducir fielmente la enfermedad a nivel fenotípico, clínico y celular con el fin de comparar estos datos con los disponibles en humanos.
2. Estudiar el papel de la expresión constitutiva reforzada de *HGAL* en la formación de los centros germinales, condicionada a cada uno de los estadios de desarrollo celular: progenitores no comprometidos, progenitores de linaje celular B y células B del centro germinal en un nuevo modelo experimental. El posterior análisis de estos datos permitirá establecer una propuesta alternativa para el abordaje del estudio de la función de *HGAL*.
3. Estudiar la repercusión y el grado de implicación de la ganancia de función de *HGAL* en la patogenia del linfoma de células grandes B difuso en ratón, a través del estudio y secuenciación de muestras tumorales y la identificación de potenciales vías de señalización afectadas, para la identificación de nuevas aproximaciones terapéuticas.

Material y Métodos

Material y Métodos

1. Generación de cepas de ratón

El trabajo experimental con el modelo murino se ha llevado a cabo conforme a las directrices establecidas por las normas nacionales e internacionales, acerca del cuidado y bienestar animal. Dicho trabajo fue aprobado por el Comité de Bioética de la Universidad de Salamanca, así como por la Subcomisión de Bioética del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). Hay que mencionar que, para el desarrollo de este proyecto de investigación, se ha contado con formación en capacitación para experimentación animal (categorías A-E), así como formación continuada a través de *Animalaria*, *Charles River* y *European Schoolnet Academy*.

Los ratones *Rosa26^{HGAL}* fueron generados de la siguiente forma: el clon de ADNc, obtenido conforme a lo descrito en el epígrafe ‘11. Síntesis de ADNc’, de HGAL se subclonó dentro del plásmido Rosa26UA empleando el sitio AscI. Este plásmido contenía la construcción LoxP-pgk-Neo-tPA-LoxP-AscI-FheI-IRES-EGFP dentro los brazos de homología del locus Rosa26, dando lugar a la construcción de orientación final LoxP-pgk-Neo137-tPA-LoxP-HGAL-IRES-EGFP¹³⁰.

La línea de células ES de ratón G4¹⁸⁶, se usó para modificar el locus Rosa26 por recombinación homóloga en el Servicio de Transgénesis del Centro Nacional de Biotecnología-Centro de Biología Molecular Severo Ochoa dependientes de la actividad de la Universidad Autónoma de Madrid (UAM) y el CSIC. El vector Rosa26^{HGAL} fue introducido mediante electroporación en las mencionadas células madre embrionarias (ES) para su recombinación homóloga, separando y aislando aquellos clones celulares resistentes a neomicina. Posteriormente, los recombinantes homólogos obtenidos fueron seleccionados por PCR, *Southern Blot* y cariotipo para inyectarse en la masa celular interna de los blastocistos de embriones murinos. Una vez introducidos, los embriones generados fueron transferidos al útero de una hembra pseudopreñada y se obtuvieron ratones quimera¹³¹.

Se obtuvieron animales heterocigotos *Rosa26^{HGAL}* después del apareamiento de ratones quimera con hembras C57BL/6J. Los ratones *Rosa26^{HGAL}* se cruzaron con ratones *Sca1-Cre*, *Mb1-Cre* o *Aid-Cre* para generar ratones *Rosa26^{HGAL}/Sca1-Cre¹⁸⁷*, *Rosa26^{HGAL}/Mb1-Cre⁵⁹* y *Rosa26^{HGAL}/Aid-Cre¹⁷³* respectivamente^{129–132}. Todos los ratones generados y empleados en este trabajo de Tesis Doctoral poseen un *background* mixto CBAXC57BL/6J. Para su genotipado se emplearon técnicas de *Southern-Blot* y PCR, detallados en los epígrafes inmediatamente inferiores^{58,59}.

Una vez observados los signos y las manifestaciones clínicas de la enfermedad, los ratones fueron sacrificados y sometidos a procedimientos de necropsia estándar. Todos los órganos principales fueron examinados bajo el microscopio de disección. En lo que se refiere a estos órganos, se tomaron muestras de porciones homogéneas de dicho órgano resecado, se fijaron inmediatamente después de la escisión en formaldehído y se les aplicó distintas estrategias de tinción a fin de delimitar la arquitectura y organización del centro germinal (HE, PAX5, B220 y PNA), en el Servicio de Patología Molecular Comparada del Centro de Investigación del Cáncer (CIC). Finalmente, una vez que estos animales fueron dados de baja en nuestra base de datos, se realizaron análisis de supervivencia de *Kaplan-Meier* mediante la prueba de rango logarítmico (*Mantel-Cox test*), a fin de observar potenciales diferencias entre los ratones control (WT) y los ratones modificados genéticamente. Hay que mencionar que todos los ratones que no desarrollaron linfoma fueron sacrificados al alcanzar los 2 años (**Figura 12**), pues ninguno de ellos murió por causas distintas a la patología de interés de nuestro estudio.

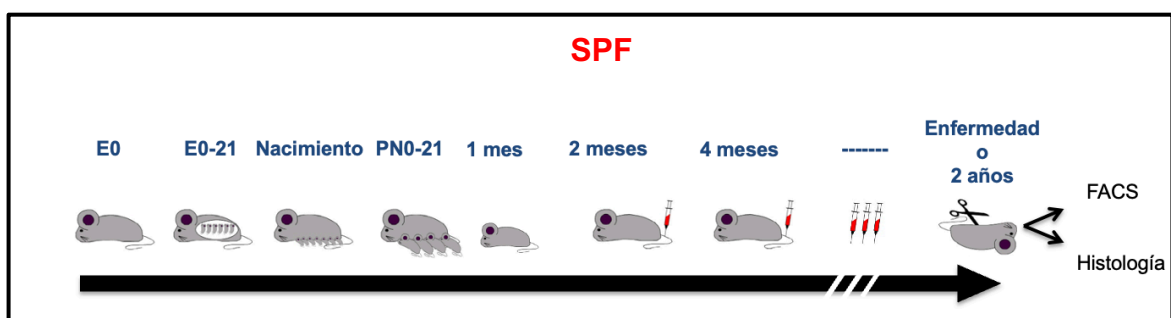


Figura 12. Seguimiento de las cepas de ratones generadas. Todos los ratones nacen, se crían y son mantenidos a lo largo del tiempo en el animalario bajo estrictas condiciones de ausencia de patógenos (SPF; **Anexo 2**). Durante este tiempo, los animales son sangrados periódicamente, de forma bimensual, para valorar su estado de salud y detectar la posible aparición de la enfermedad (LCGBD), tras el análisis por citometría flujo (FACS) de la sangre periférica obtenida; además de observar su aspecto físico, apetito y comportamiento. En el caso de que el ratón muestre signos y/o síntomas de fenotipo enfermo o haya cumplido los 2 años, este se sacrifica y se analizan todos los tejidos hematopoyéticos por citometría de flujo (ver ‘Materiales y métodos: 4.1. Análisis de poblaciones celulares por citometría de flujo’), así como el resto de los órganos para su posterior análisis histológico e inmunohistoquímico (ver ‘Materiales y métodos: 4.3. Análisis histológico e inmunohistoquímico’). Elaboración propia.

2. Genotipado de cepas de ratón mediante Southern Blot

La cepa de ratones *Rosa26^{HGAL}* se genotipó por *Southern Blot*. Para llevar a cabo esta técnica, se extrajo ADN genómico de los ratones, procedimiento descrito más adelante en el apartado '9. Extracción de ADN', a partir de un fragmento de cola. Posteriormente, el ADN fue resuspendido en un volumen de 50-70 μL de MPW y se incubaron 10 μg de ADN a 37°C con 20U de endonucleasa de restricción EcoRI. Después de 5 horas de digestión enzimática, la reacción se detuvo y todos los fragmentos obtenidos se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa, para ser después desnaturalizados por inmersión en una solución alcalina desnaturalizante que consiste en NaCl 1,5M y NaOH 0,5M.

La desnaturalización se realizó en condiciones de agitación continua y temperatura ambiente durante 45 min, a fin de poder romper los enlaces de puentes de hidrógeno que unen los nucleótidos, obteniendo así fragmentos de ADN monocatenario. A continuación, se neutralizó dicha reacción desnaturalizante mediante una solución específica de NaCl 1,5M; Tris-HCl 1M a pH 7,5 en condiciones de temperatura ambiente durante 45 minutos y agitación continua. Después, se continuó el proceso con la transferencia de ADN a una membrana de nailon (Ref. RPN 303-N, GE Healthcare) durante 16 horas, empleando como tampón de transferencia la combinación de NaCl 6M, citrato sódico dibásico 0,6M a pH 7 (20X SSC). Posteriormente, se sometió a la membrana a una fuente de luz UV de 312 nm durante 20s, con objeto de lograr la unión covalente del ADN a esta (*UV Stratalinker 2400*, Stratagene).

Finalmente, se realizó la hibridación del ADN, ya unido covalentemente a la membrana usando el fragmento 'RA-4' como sonda radiactiva, obtenido de un plásmido del laboratorio de *Stuart Orkin* en Boston. Este consiste en un vector de 4 kilobases (kb) de ADN genómico del locus *Rosa26*. Por digestión con las enzimas de restricción EcoRI y PacI, se generó un fragmento de 693 pares de bases (pb) marcado radiactivamente con desoxinucleótidos de citosina trifosfato asociados a fósforo-32 (dCTP-P³²), empleado como sonda de hibridación para el ADN genómico unido a la membrana. Paralelamente, se realizaron técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), descritas en el siguiente apartado.

En lo que respecta a los ratones *Sca1-Cre*, *Mb1-Cre* y *Aid-Cre*; estos se genotiparon por *Southern Blot* siguiendo el procedimiento anteriormente descrito, salvo por el empleo de la sonda Cre correspondiente a la parte del ADNc del gen que codifica para la Cre recombinasa. Después, esta sonda fue hibridada con el ADN genómico murino de interés con 20U de la enzima endonucleasa de restricción EcoRI. El genotipado de estos ratones (*Rosa26^{HGAL}/Sca1-Cre*, *Rosa26^{HGAL}/Mb1-Cre* y *Rosa26^{HGAL}/Aid-Cre*) por *Southern Blot* ya ha sido descrito^{150,156}.

3. Genotipado de cepas de ratón mediante PCR

A fin de genotipar algunas cepas de ratón, se realizó una PCR del ADN extraído de un fragmento de cola de los ratones de interés, siguiendo exhaustivamente el procedimiento detallado en el siguiente epígrafe.

3.1. Genotipado de cepas de ratón mediante PCR de GFP

Para la PCR de *GFP*, se preparó un mix de reacción que consistía en 2,5µL del oligo de sentido 10µM; 2,5µL del oligo anti-sentido 10µM; 2,5µL de un *buffer* comercial (Ref. 2900162, 5PRIME); 2,5µL dNTPs 2mM; 2,5µL MgCl₂ 25mM (Ref. 2900154, 5Prime); 1U del enzima Taq DNA polimerasa (Ref. 2900163, 5PRIME); 11,3µL MPW, 1µL de ADN y una gota de aceite mineral (Ref. M3516-6ML, Sigma). Se emplearon los siguientes oligos (5' → 3'):

GFP-FP2	sentido: AGC ACG ACT TCT TCA AGT CC
GFP-RP1	anti-sentido: TCC ATG CCG AGA GTG ATC C

La mezcla de esta reacción fue amplificada usando un termociclador de gradiente (*Mastercycler*, Eppendorf), empleando el siguiente programa: 95°C, 4' + [94°C, 30'' + 58°C, 30'' + 72°C, 1'] x 35 ciclos + 72°C, 10' + 4°C. Finalmente, el producto de esta amplificación, de un tamaño de 450 pb se corrió en un gel de agarosa al 2% a 65V 1 hora.

3.2. Genotipado de cepas de ratón mediante PCR de neo

Para realizar la PCR de *neo* de los ratones *Rosa26^{HGAL}*, se preparó la siguiente mezcla de reacción: 2,5µL del oligo ‘oIMR013’ 10µM, 2,5µL del oligo ‘oIMR014’ 10µM, 2,5µL del oligo ‘oIMR015’ 10µM, 2,5µL del oligo ‘oIMR016’ 10µM, 5µL del tampón comercial *Green GoTaq Flexi Buffer* (Ref. M891A *GoTaqFlexi DNA Polymerase*, Promega), 2,5µL dNTPs 2mM; 2,5µL MgCl₂ 15mM, 1U de enzima *GoTaq DNA Polymerase* (Ref. M829A, Promega), 3,8µL MPW, 1µL de ADN y una gota de aceite mineral (Ref. M3516-6ML, Sigma). Los oligos utilizados fueron (5' → 3'):

IMR013 sentido: CTT GGG TGG AGA GGC TAT TC

IMR014 anti-sentido: AGG TGA GAT GAC AGG AGA TC

IMR015 sentido: CAA ATG TTG CTT GTC TGG TG

IMR016 anti-sentido: GTC AGT CGA GTG CAC AGT TT

La mezcla obtenida fue amplificada empleando un termociclador de gradiente (*Mastercycler*, Eppendorf) usando el siguiente programa: 94°C, 3' + [94°C, 20''+ 64°C, 30''+ 72°C, 35''] - 0,5°C en la elongación por ciclo hasta [94°C, 20''+ 58°C, 30''+ 72°C, 35''] x 30 ciclos + 72°C, 2' + 4°C. El producto amplificado (*neo*) de 280pb se corrió en un gel de agarosa al 2% a 65V durante 1 hora, junto con una banda de control interna.

3.3. Genotipado de cepas de ratón mediante PCR de *Scal-Cre*

Los ratones *Scal-Cre* se genotiparon mediante PCR de *Cre*. Para la PCR se preparó una mezcla de reacción conteniendo 2,5µL del oligo CRE-F 10µM, 2,5µL del oligo CRE B 10µM, 2,5µL de un buffer comercial (Ref. 2900162, 5PRIME), 2,5µL dNTPs 2mM, 2,5µL MgCl₂ 25mM (Ref. 2900154, 5PRIME), 0,2µL del enzima Taq DNA polimerasa (Ref.2900163, 5PRIME), 11,3µL MPW y 1µL de DNA. La mezcla de reacción se amplificó usando un termociclador de gradiente (*Mastercycler*, Eppendorf) con las siguientes condiciones: 94°C 10min; (94°C 30seg, 50°C 1min, 72°C 30seg) x 35 ciclos a 72°C durante 2min. El producto de la amplificación tenía un tamaño de 376pb.

Los oligos utilizados fueron los siguientes (5' → 3'):

CRE-F: GCCGATGCAACGAGTGATGA

CRE-B: GCTATCCTGGCAGCGATCGC

3.4. Genotipado de cepas de ratón mediante PCR de Mb1-Cre

Las cepas de ratón *Mb1-Cre* fueron genotipadas por dos reacciones de PCR independientes, pero paralelas. Sendas reacciones presentaban una mezcla común: 2,5µL del oligo 'sen' 10µM; 2,5µL del oligo 'anti-sen' 10µM, 2,5µL de un *buffer* comercial (Ref. 2900162, 5PRIME), 2,5µL dNTPs 2mM, 2,5µL MgCl₂ 25mM (Ref. 2900154, 5PRIME), 1U del enzima Taq DNA polimerasa (Ref. 2900163, 5Prime), 11,3µL MPW, 1µL de ADN y una gota de aceite mineral (Ref. M3516-6ML, Sigma). Los oligos utilizados fueron los siguientes (5' → 3'):

Mb1	sentido: CTG CGG GTA GAA GGG GGT C
	anti-sentido: CCT TGC GAG GTC AGG GAG CC
hCre	sentido: CCC TGT GGA TGC CAC CTC
	anti-sentido: GTC CTG GCA TCT GTC AGA G

Posteriormente, la mezcla de cada una de las reacciones para PCR fue amplificadas en un termociclador de gradiente (*Mastercycler*, Eppendorf) usando el siguiente programa: 95°C, 4'30'' + [95°C, 30'' + 65°C, 45'' + 72°C, 30''] x 36 ciclos + 72°C, 2' + 4°C.

El producto amplificado de 'Mb1' constaba de 420 pb y el de 'hCre' 430 pb. Sendos productos se corrieron en un gel de agarosa al 2% a 65V durante 1 hora. La presencia de una única banda de 420 pb era indicativa de un genotipo silvestre (control, *Wild-Type/WT*), mientras que la presencia de dos bandas en el gel determinaba un genotipo *Mb1-Cre*.

3.5. Genotipado de cepas de ratón mediante PCR de Aid-Cre

Se preparó una mezcla de reacción conteniendo 2,5µL del cebador “PR1” 10µM, 2,5µL del cebador ‘PR2’ 10µM; 2,5µL de un buffer comercial (Ref. 2900162, 5PRIME), 2,5µL dNTPs 2mM, 2,5µL MgCl₂ 25mM (Ref. 2900154, 5PRIME), 1U del enzima Taq DNA polimerasa (Ref.2900163, 5PRIME), 11,3µL MPW y 1µL de DNA y una gota de aceite mineral (Ref. M3516-6ML, SIGMA). Los oligos utilizados fueron los siguientes (5' → 3'):

AID-CRE PR1: TAA GAC CAT GTC CAA AGC CCA

AID-CRE PR2: TCG ACC GGT AAT GCA GGC AAA

La mezcla de reacción se amplificó usando un termociclador de gradiente (*Mastercycler*, Eppendorf) mediante el siguiente programa: 94°C, 5' + [94°C, 30'' + 53°C, 30'' + 72°C, 30'] x 34 ciclos + 72°C, 5' + 4°C. El producto de la amplificación tenía un tamaño de 700pb y se corrió en un gel de agarosa al 2% a 65V durante 1 hora.

4. Análisis e identificación de poblaciones celulares

4.1. Análisis de poblaciones celulares por citometría de flujo

Los leucocitos se obtuvieron de la médula ósea total (lavado de huesos largos), sangre periférica, timo, ganglios linfáticos y bazo de los ratones. Para ello, los eritrocitos fueron eliminados por lisis con un tampón específico para ello (*Red Cell Lysis Buffer*, RCLB) y las células restantes se lavaron en una solución de PBS con FCS al 1%.

Tras la tinción, las células se lavaron de nuevo con la mezcla PBS-FCS y, posteriormente, teñida con yoduro de propidio (PI) a una concentración de 2 mg/mL, a fin de excluir las células muertas y *debris* celular del análisis y clasificación ulteriores^{40,48}.

Las muestras preparadas fueron adquiridas en un citómetro de flujo Accuri C6 (Beckton Dickinson) y se analizaron utilizando el software *FlowJo* (TreeStar).

Se utilizó la fluorescencia específica de FITC y APC excitados a 488 nm (0,4 W) y 633 nm (30 mW), respectivamente, así como propiedades conocidas de dispersión de luz ortogonal y directa de células de ratón para establecer los *gates*. La posible unión inespecífica de anticuerpos se evitó mediante la preincubación de las células con una solución de *Fc-Block* CD16/CD32 (2.4G2). Para cada análisis, se evaluaron un total de, al menos, 100.000 células viables, negativas para PI. Para la citometría de flujo se utilizaron los anticuerpos: anti-B220 (RA3-6B2), anti-CD3 ϵ (145-2C11), anti-CD4 (RM4-5; 1:250), anti-CD8a (53-6.7; 1:250), anti-CD11b/ Mac-1 (M1/70), anti-CD19 (1D3), anti-Ly-6G/Ly-6c o anti-Gr-1 (RB6-8C5), anti-CD44 (IM7), anti-IgD (11-26c.2a), anti-CD23 (B3B4), anti-CD25 (PC61), anti-CD117/c-Kit (2B8), anti-IgM (II/41), anti-CD21 (7G6), anti-CD45 (30F-11), anti-Sca1 (E13-161.7), anti-CD95 (Jo2), PNA (FL-1071), anti-Ter-119 (TER119) y anti-GL7 (GL7).

La estrategia de FACS de diferentes etapas de desarrollo se realizó así (**Figura 13**): células T CD4 (CD4⁺ CD8⁻), células T CD8 (CD4⁻CD8⁺), BM HSC (Lin-Sca1^{hi} c-Kit^{hi}), células MO pro-B (CD19⁺c-Kit⁺), células pre-B de MO (B220⁺CD25⁺IgM⁻), células B inmaduras de MO y bazo (B220⁺IgM^{hi}IgD⁻), células B recirculantes de MO (B220^{hi}IgD^{hi}IgM^{lo}), células B de transición periféricas (B220⁺IgM^{hi}IgD^{hi}), células B maduras periféricas (B220⁺IgM^{lo}IgD^{hi}), células B de la zona marginal (MZ) (B220⁺CD21^{hi}CD23^{lo}), células B foliculares periféricas (FO) (B220⁺CD21^{int}CD23^{hi}) y células mieloides (Gr-1^{hi} Mac-1^{hi}). Todos los anticuerpos se adquirieron de BD Biosciences y se usaron en diluciones de 1:100, salvo que se especifique lo contrario.

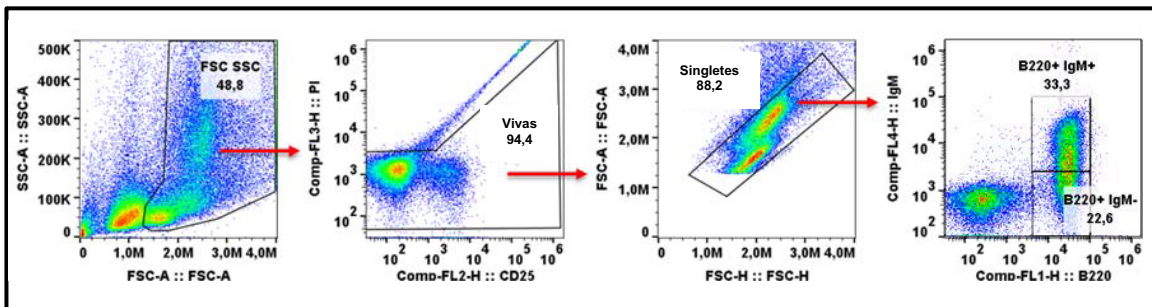


Figura 13. Estrategia de gating empleada para el análisis por citometría de flujo. Figura representativa de la estrategia de gating usada en todos los análisis de citometría de flujo del estudio. Para cada análisis, se evaluaron un total de, al menos, 100.000 células viables (PI: células negativas para yoduro de propidio). Los *singletes* (tercer *gate*, *Singletes*) fueron seleccionados antes de seleccionar los *gates* específicos para cada población de interés (cuarto *gate*, B220/IgM), después de haber seleccionado la población total leucocitaria (primer *gate*, FSC-A/SSC-A) y las células vivas dentro de dicho *gate* (segundo *gate*, *Vivas*). Se muestran como ejemplo, células B esplénicas de un ratón control WT teñidas con IgM-APC y B220-FITC. La misma estrategia de gating ha sido llevada a cabo en todos los análisis de citometría de flujo presentados en las siguientes figuras: 16A, 16B, 17A, 17B, 19A 22B, 23B y 24B. Elaboración propia.

4.2. Análisis de la formación del centro germinal

Con el fin de estudiar y analizar la formación de centros germinales en nuestros modelos experimentales, se procedió a inmunizarlos mediante una inyección de eritrocitos de cordero (SRBCs; Ref. SR0051C, Thermo Scientific). En total, se inyectaron $1-2 \times 10^8$ células exógenas en el peritoneo de ratones control y transgénicos. Tras 10 días¹⁸⁸, se sacrificaron los animales y se analizaron los bazos mediante inmunohistoquímica, reservando parte del tejido para su posterior análisis por citometría de flujo. Como control, se aislaron bazos de ratones transgénicos, se incluyeron en compuesto OCT (Sakura) y se congelaron instantáneamente en hielo seco. Se tiñeron criosecciones del bazo con un anticuerpo FITC-anti-IgD (BD Biosciences) y PNA biotinilados (B-1075, Vector Laboratories). La señal de FITC-anti-IgD se detectó con un anticuerpo anti-FITC acoplado a fosfatasa alcalina (Roche), que se visualizó mediante incubación con *Fast Red* (Sigma). Por otro lado, se detectó PNA biotinilado con estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano picante (Zymed) seguido de una incubación con diaminobencidina (DAB; Sigma).

La parte reservada del bazo (2×10^6 células en 200 μ L), se tiñó con anticuerpos frente a B220, PNA, CD95 y GL7, para poder determinar la capacidad de formación de células B del centro germinal^{93,122,146,170,171}.

4.3. Análisis histológico e inmunohistoquímico

Los animales fueron sacrificados mediante dislocación cervical y las muestras obtenidas de estos se fijaron en formaldehído al 4% y posteriormente, incluidas en parafina, tal y como ha sido previamente descrito por el equipo de investigación^{156,188}. Los análisis de patología molecular comparada se llevaron a cabo sobre secciones teñidas con hematoxilina-eosina (HE), bajo la supervisión del experto en patología Óscar Blanco, del Hospital Universitario de Salamanca.

Para el análisis inmunohistoquímico exhaustivo^{37,83,84,124,151,152,189,190}, las muestras de los ratones transgénicos fueron cortadas, desparafinadas y calentadas en citrato sódico 10 mmol/L, durante 30 minutos y posteriormente incubadas con anticuerpos primarios. Los anticuerpos primarios y condiciones empleados fueron: anti-HGAL humano (clon MRQ-49; *Cell Marque Corporation*, Rocklin, CA), anti-PAX5 (clon 24/PAX5, 1:100; *BD Biosciences*, San Jose, CA), anti-B220 (clon RA3-6B2, dilución 1:50; *Santa Cruz Biotechnology, Inc.*, Santa Cruz, CA), PNA (1:1000; *VECTOR Laboratories*, Burlingame, CA), anti-IRF4 (clon M-17, 1:60; *Santa Cruz Biotechnology, Inc.*), anti-BCL6 (clon D-8, 1:5; *Santa Cruz Biotechnology*) y anti-CD3 (clon 60 SP7, 1:50; *Abcam*, Cambridge, MA). El anticuerpo anti-HGAL no reacciona de forma cruzada con M-17 en la tinción inmunohistoquímica. Los kits de tinción de *VECTOR Laboratories* y *Santa Cruz Biotechnology* fueron utilizados tanto para el análisis histoquímico como para la detección de anticuerpos murinos mientras que, en el caso de anticuerpos humanos, se emplearon métodos automatizados de inmunotinción (Ventana XT; *Ventana Medical Systems*, Tucson, AZ)¹⁰⁴.

Las muestras fueron diagnosticadas utilizando criterios uniformes basados en criterios clínicos, histológicos, inmunofenotípicos y características moleculares. Para los estudios comparativos, se utilizaron ratones de la misma edad¹⁵⁰.

4.4. Estudios *in vitro* de la función de HGAL

Todos los experimentos descritos a continuación, se realizaron en colaboración con el grupo del Dr. Izidore Lossos de la Universidad de Miami. Los anticuerpos monoclonales de ratón anti-HGAL, así como los plásmidos codificantes de HGAL, se generaron en el laboratorio del Doctor Izidore Lossos de la Universidad de Miami^{141,144}. Se usaron también los anticuerpos β -actina (St. Louis, MO), *goat F(ab')₂ anti-mouse IgM* y todo el panel de isotipos de inmunoglobulinas de ratón (*Southern Biotech*, Birmingham, AL). Para los experimentos *in vitro* de función de HGAL se usó la línea celular humana de linfoma no Hodgkin *Raji*. Dicha línea celular, se hizo crecer en medio RPMI 1640 (*Fisher Scientific*, Santa Clara, CA) suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS; *Hyclone Logan*, UT), glutamina 2mM y 100 unidades/mL de penicilina y 100 μ g/mL de estreptomina (*Invitrogen-GIBCO*, Grand Island, NY) a 37°C y 5% de CO₂.

Para la transfección de plásmidos o siRNA en la línea celular utilizada se usó el equipo de transfección *Amaxa Nucleofector Kit* (Amaxa Inc. Gaithersburg, MD). Para ello, se centrifugaron 3 millones de células por muestra de Nucleofector V, durante 5 minutos a 200g, que después fueron resuspendidas a temperatura ambiente en 100µL de solución. A continuación, se añadieron 2µg de siRNA o del plásmido correspondiente a las suspensiones celulares y las mismas fueron transferidas a cubetas *Amaxa*. La nucleofección se llevó a cabo usando el programa M-013. Tras la transfección, las células fueron incubadas durante 48h en un incubador a 37°C y atmósfera de 5% de CO₂.

5. Análisis y extracción a partir de tejidos hematopoyéticos

5.1. Análisis de expresión proteica mediante *Western Blot*

Para la transferencia de Western, se separaron 20 mg de lisado de células completas corriendo un gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) al 12%, transferido a membranas de difluoruro de polivinilideno (*Bio-Rad Laboratories*, Hercules, CA) y bloqueado con 5% leche sin grasa en PBS con *Tween 20* al 0,1 % durante 1 hora. Posteriormente, la membrana se incubó con los anticuerpos primarios especificados durante 1 hora a temperatura ambiente o a 4°C durante toda la noche.

Las membranas se lavaron 3 veces en PBS con *Tween 20* al 0,1 % durante 5 minutos y después incubadas con los correspondientes anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano picante, para ser visualizado por *SuperSignal Western Pico Chemiluminiscente Substrate* o *SuperSignal Western Femto Quimioluminiscente Substrate* (*Pierce Biotech*, Rockford, IL). Los anticuerpos primarios empleados fueron: anti-HGAL^{145,150,154,185} (1:1000), anti-BCL6^{60,87,92-95,99} (clon D-8, 1:5; *Santa Cruz Biotechnology*), y anti-actina (I-19, sc-1616, 1:7500; *Santa Cruz Biotechnology*). Los anticuerpos secundarios utilizados fueron: un conjugado de cabra anti-IgG murino (H+L)-HRP (170-6516, 1:5000; *Bio-Rad*) y un conjugado de burro anti-IgG-HRP (sc-2033, 1:7500; *Santa Cruz Biotechnology*).

5.2. Extracción de ADN

Los tejidos fueron disgregados con 500µl o 5ml, en función de la celularidad de cada tejido, de tampón proteinasa K (sacarosa 0,25M; Tris 50mM a pH 7,4; KCl 25mM; MgCl₂ 5mM; SDS al 1%; EDTA 20mM a pH 8 y 1µg de proteinasa K, Roche) durante 16h a 55°C. Tras el periodo de incubación, se llevó a cabo una extracción fenol-cloroformo para purificar el ADN de restos celulares. Esta extracción consistió en la adición de fenol (Gibco BRL) a la muestra incubada, seguida de una centrifugación de 5 minutos a máxima velocidad a temperatura ambiente y se reservó el sobrenadante.

A continuación, se añadió este sobrenadante a medio volumen de fenol y medio volumen de cloroformo (Merk) para, posteriormente, centrifugar la muestra a máxima velocidad durante 5 minutos a temperatura ambiente. Nuevamente, se reservó el sobrenadante y se añadió a un volumen de cloroformo, repitiendo el mismo protocolo de centrifugación. El sobrenadante obtenido se precipitó en 2 volúmenes de etanol al 100% (Merck) y el ADN precipitado se lavó con etanol al 70% para, por último, resuspenderlo en agua bidestilada (ddH₂O). Finalmente, el ADN resultante y resuspendido fue cuantificado con el espectrofotómetro Nanodrop-1000 (THERMO Scientific), con una medida de absorción a 260nm.

5.3. Análisis de clonalidad por reordenamiento de inmunoglobulinas

Los reordenamientos de las inmunoglobulinas ^{61,149,188} fueron amplificados por PCR siguiendo estas condiciones: activación inicial a 95°C seguida por 31-37 ciclos de desnaturalización (1 minuto a 95°C), anillamiento (1 minuto a 65°C) y elongación (1 minuto y 45 segundos a 72°C). Seguidamente, tuvo lugar una elongación final de 10 minutos a 72°C.

Para determinar las secuencias de ADN de cada reordenamiento V(D)J individual, los fragmentos de PCR fueron aislados del gel de agarosa 0,8% y clonados en el vector *pGEM-Teasy* (Promega). Los insertos de ADN de, al menos, 10 clones correspondientes al mismo fragmento de la PCR fueron secuenciados para comprobar su clonalidad¹⁹¹⁻¹⁹³. Los oligos empleados para este análisis fueron los siguientes (5' → 3'):

V _H J558	sentido: CGAGCTCTCCARCACAGCCTWCATGCARCTCARC anti-sentido: GTCTAGATTCTCACAAGAGTCCGATAGACCCTGG
V _H 7183	sentido: CGGTACCAAGAASAMCCTGTWCCTGCAAATGASC anti-sentido: GTCTAGATTCTCACAAGAGTCCGATAGACCCTGG
V _H Q52	sentido: CGGTACCAGACTGARCATCASC AAGGACAAYTCC anti-sentido: GTCTAGATTCTCACAAGAGTCCGATAGACCCTGG
DH:	sentido: TTCAAAGCACAATGCCTGGCT anti-sentido: GTCTAGATTCTCACAAGAGTCCGATAGACCCTGG
C _μ	sentido: TGGCCATGGGCTGCCTAGCCCGGGACTT anti-sentido: GCCTGACTGAGCTCACACAAGGAGG

5.4. Extracción de ARN

Los tejidos fueron disgregados con filtros celulares de 70μm de nailon (*BD*, Falcon). A continuación, se extrajo el ARN utilizando TRIzol (Life Technologies), siguiendo las instrucciones del fabricante. La calidad, integridad y pureza del ARN resultante se calcularon en función del cociente entre la longitud de onda de absorción del ARN (260nm) y de las proteínas (280nm) utilizando el espectrofotómetro Nanodrop-100 (THERMO Scientific). Los restos de fenol derivados del uso de TRIzol se eliminaron para evitar potenciales interferencias de este. Para ello, se usó el kit comercial *Rneasy Mini Kit* (Ref. 74104, Qiagen) y el protocolo de limpieza del ARN de este^{86,135}

5.5. Síntesis de ADNc

Trabajando en condiciones *RNasa free* se procedió a añadir en un *Eppendorf* vacío, en hielo, un volumen de 13 μ L que consistía en: agua bidestilada (ddH₂O), 1 μ L de *RNasin* (30U; Promega) y 5 μ g de ARN (previamente cuantificado en el espectrofotómetro Nanodrop-100; THERMO Scientific). Esta muestra se incubó durante 5 minutos a 65°C. A continuación, se añadió a temperatura ambiente: 0,5 μ L de oligo d(T) *mRNA primer* (New England BioLabs), 1 μ L de *RNasin*, 4 μ L de *buffer 5x* (Tris-HCl 50mM a pH 8,3; KCl 100mM; MgCl₂ 10mM; DTT 5mM; dGTP 500 μ M; dATP 500 μ M; dTTP 500 μ M y dCTP 500 μ M) y 1 μ L de *RTasa* (20U; *superRT*, Anglia). La muestra fue posteriormente incubada durante 5 minutos a 42°C y resuspendida en agua bidestilada.

5.6. Perfil de expresión génica de los tumores murinos

Se recolectaron bazos con tumores de ratones transgénicos y bazos sanos de ratones *WT*^{84,194–198}. Las células se pasaron por *sorting* antes de la extracción de ARN. El ARN total se aisló en 2 pasos utilizando el reactivo TRIzol (Life Technologies), seguido de purificación con *RNeasy Mini Kit* (Qiagen) tal y como indica el protocolo de purificación, siendo opcional el tratamiento en columna con DNasa. La integridad y la calidad del ARN fueron verificadas por electroforesis y se midió su concentración.

6. Análisis , tratamiento e interpretación de los resultados

6.1. Análisis bioinformático

Las muestras se analizaron usando matrices *Affymetrix Mouse Genome 430 2.0*. Estas metodologías consisten en el uso de un programa específico, que emplea el algoritmo de análisis de *microarrays*⁸¹ se utilizó para la corrección de fondo, normalización intra e inter-*microarray* y cálculo de la señal de expresión¹⁹⁹

Una vez que la señal de expresión absoluta para cada gen (el valor de la señal para cada conjunto de sondas) fue calculada en cada *microarray*, se llevó a cabo el método de análisis de significación de *microarray* (SAM)¹⁹⁹ para calcular la expresión diferencial significativa y para encontrar conjuntos de sondas de genes que caracterizaron los linfomas de células B de ratones transgénicos, comparándolos con aquellos que apreciaron en los bazos sanos de ratones control (*WT*). Este método emplea permutaciones para calcular robustamente la inferencia estadística de la mayoría de los genes, proporcionando p-valores ajustados a múltiples pruebas empleando la tasa de falso descubrimiento (FDR)²⁰⁰. En este caso, se optó por un corte de, al menos, 0,05 para los cálculos de expresión diferencial. Todos los análisis se realizaron utilizando *R* y *Bioconductor*^{201,202}. Los datos presentados en esta Tesis Doctoral han sido publicados y depositados en la plataforma *Gene Expression Omnibus* y son accesibles a través del número de acceso: GSE142368²⁰³.

Los análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes (GSEA) se realizaron utilizando *GSEA v2.2* y colección distintiva de conjuntos de genes, a través de la plataforma MSigDB (<http://www.broad.mit.edu/gsea/>)²⁰⁴. Este GSEA se llevó a cabo mediante un método estadístico de enriquecimiento ponderado, la clasificación métrica de la señal de ruido y corregida para múltiples pruebas de hipótesis empleando 1000 permutaciones para proporcionar una tasa de falso descubrimiento corregido (FDR) q-valor^{200,205,206}.

Todo ello permitió buscar y encontrar diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes fenotipos sometidos a estudio^{78,79}. Las firmas de expresión génica que están específicamente activadas o reprimidas en el LCGBD humano y los conjuntos de genes de identidad celular B fueron también testados para el enriquecimiento dentro de las muestras tumorales utilizando GSEA, así como los conjuntos de genes solapados en vías de señalización asociadas a estos primeros.

6.2. Preparación de librerías de exoma murino y secuenciación

El ADN fue extraído y purificado del bazo de ratones con LCGBD y ratones control sanos usando el mini kit de ADN/ARN *AllPrep* (Qiagen) según las instrucciones del fabricante^{207–209}. La biblioteca de exomas se preparó con el kit *Agilent SureSelectXT Mouse All Exon* con algunas modificaciones. La captura del exoma se realizó mediante hibridación con una biblioteca de ARN siguiendo el protocolo del fabricante^{210,211}. La biblioteca capturada se purificó y enriqueció uniéndola a *MyOne Streptavidin T1 Dynabeads* (Life Technologies) y su posterior amplificación por PCR libre de *beads* en el rango lineal. La secuenciación (2×100 pb) se llevó a cabo en un *HiSeq2500* (Illumina) utilizando el *TruSeq SBS Kit v3* con una lectura de índice de 6 pb^{212–215}.

Para el análisis de secuenciación^{85,216}, se alinearon archivos *fastq* sin procesar para muestras tumorales y normales al genoma de referencia (versión GRCm38) usando *BWA-kit* versión 0.7.12 con parámetros predeterminados. La deduplicación y la realineación alrededor de *indels* fue llevada a cabo usando *MarkDuplicates* e *IndelRealigner* en *GATK* v4.0.4.0. Las variantes de un solo nucleótido, *indels* y su potencial impacto funcional fueron nombrados usando *Manta* v1.4.0 y *Strelka* v2.9.4 con parámetros predeterminados. *Varscan* versión 2.4.3 se usó para generar nomenclaturas de número de copia usando archivos de compilación generados a partir de archivos *BAM* con samtools 99,123,213,217–219.

Las regiones de cambio de número de copias se determinaron utilizando el *CAN-smooth*, mientras que las alteraciones en el número de copias y las funciones de segmento del paquete *DNAcopy* v1.46 fueron determinadas en *R*¹¹². Las variantes significativas del número de copias recurrentes en las muestras se evaluaron utilizando *GISTIC2.0*^{218,220}. La presencia de mutaciones dentro de los motivos *AID* (WRCY o RGYW)²²¹ fue determinada tal y como se describe en *Sander et al*²⁰. En total, se emplearon 5 millones de células que fueron homogeneizadas en tampón RIPA (1X PBS o tampón fosfato salino, 1% Nonidet P-40, 0,5% desoxicolato de sodio, 0,1% SDS o dodecil sulfato sódico, PMSF o fluoruro de fenilmetilsulfonilo 10mM, 1µg/mL de aprotinina, y ortovanadato de sodio 100mM) durante 5 minutos en hielo. El lisado celular resultante fue centrifugado a 14000g durante 5 minutos a 4°C para eliminar todo el material insoluble.

La concentración proteica fue determinada usando el ensayo *Coomassie* (Thermo Scientific, Rockford, IL) y las muestras fueron ajustadas a igual concentración proteica. Finalmente, se llevó a cabo el análisis de la expresión de BCL6 y HGAL (ver MATERIALES Y MÉTODOS: ‘5.1. Análisis de expresión proteica mediante *Western Blot*’).

6.3. Análisis estadístico de supervivencia global y específica

Las diferencias en la supervivencia entre ratones transgénicos y ratones control (*WT*) se analizaron mediante la prueba de rango logarítmico (*Mantel-Cox*). Aquellos valores de $P < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos. El análisis estadístico fue llevado a cabo y la representación de los datos resultantes se creó utilizando el software *GraphPad Prism 5.00* (La Jolla, CA).

Resultados

Resultados

1. Generación de cepas murinas con expresión condicional de *HGAL*

Dado que los efectos de *HGAL* podrían potencialmente predisponer a la linfomagénesis y desregular la función inmune, desarrollamos modelos experimentales de ratones con una expresión condicional de *HGAL* en tres compartimentos y estadios de desarrollo hematopoyético distintos, a saber: células madre hematopoyéticas (HSC), células B de sangre periférica y células B de centro germinal (CGB) (**Figura 14A**).

Para ello, un ADNc de *HGAL* unido a través de un IRES a una secuencia que codifica una proteína fluorescente verde mejorada (eGFP) se dirigió al locus *Rosa26* expresado de forma ubicua.

A fin de evitar la transcripción de *HGAL* y eGFP del promotor *Rosa26*, se insertaron un casete de resistencia a neomicina y una señal de STOP de poliadenilación flanqueada por sitios loxP entre el promotor y las secuencias *HGAL*-IRES-eGFP (**Figura 14A**).

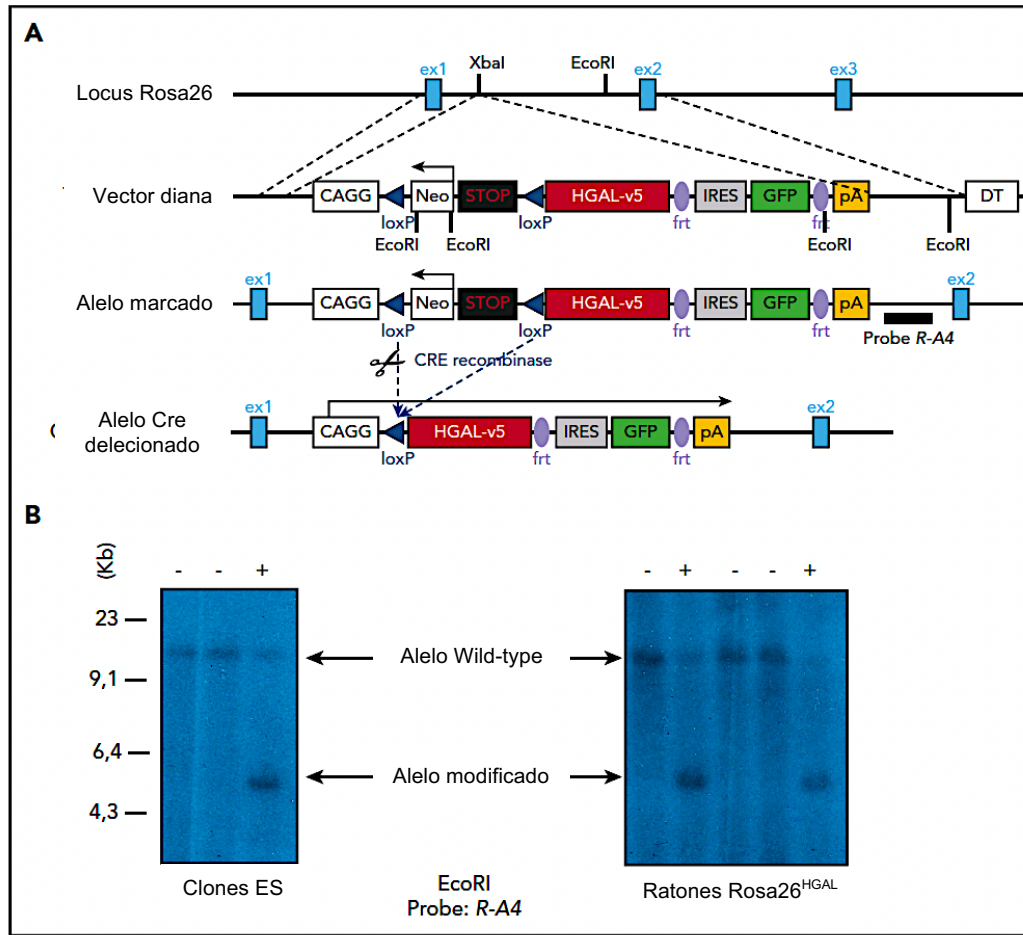


Figura 14. Expresión condicional del gen *HGAL*. (A) Diagrama esquemático que muestra el ADNc de *HGAL* clonado en un vector diseñado para dirigirse al *locus* del ratón *Rosa26*. La recombinación mediada por Cre elimina la secuencia STOP e inicia la expresión del oncogén de fusión y eGFP. Para prevenir la transcripción del gen de fusión y eGFP del promotor *Rosa26*, se insertó un casete de resistencia a neomicina y una señal de STOP de poliadenilación flanqueada por sitios loxP entre el promotor y la secuencia *HGAL*-IRES-eGFP. En ausencia de Cre, *HGAL* y eGFP no se expresan, debido a un casete STOP frente a *HGAL* que debe eliminarse mediante la acción de la Cre recombinasa para permitir su expresión. Neo, casete de resistencia a neomicina; pA, secuencia STOP de poliadenilación. (B) Se inyectaron células madre embrionarias (ES) de ratón que albergaban el alelo diana en blastocistos para generar quimeras que luego se cruzaron para generar descendencia con un alelo condicional transmisible de línea germinal de *HGAL* (designado *Rosa26^{HGAL}*). Identificación de ratones *Rosa26^{HGAL}* mediante análisis de transferencia de *Southern Blot* de ADN de un fragmento de cola tras la digestión con EcoRI. DT, se refiere al fragmento SA-PGK-neo-LacZ (DTA)-bpA insertado en el locus genómico *Rosa26*; ex1, exón1; ex2, exón2; ex3, exón 3; frt, sitio frt del sistema de recombinación específico del sitio FLP/FRT. Elaboración propia.

En la ausencia de Cre, el producto del gen *HGAL* y eGFP no son expresados⁵⁸. Las células madre embrionarias de ratón que albergan el alelo diana (Figura 14B), se inyectaron en blastocistos para generar quimeras que fueron cruzados para generar descendencia con una línea germinal transmisible del alelo condicional de *HGAL* (designado *Rosa26^{HGAL}*) (Figura 14A). El control temporal, espacial y específico de la expresión del alelo Cre se logró mediante el uso de promotores específicos.

Para expresar HGAL específicamente en linfocitos de centro germinal y evaluar su papel único circunscrito a estas células en comparación con las células B en otros estadios de desarrollo y diferenciación, se cruzaron ratones con el alelo *Rosa26^{HGAL}* con ratones portadores de Aid-Cre para iniciar la expresión de HGAL en células B del centro germinal.

Del mismo modo, para investigar los efectos potenciales de HGAL en una etapa temprana de diferenciación hematopoyética, se cruzaron ratones *Rosa26^{HGAL}* con ratones Sca1-Cre¹⁸⁷ (enfoque experimental para iniciar la expresión de HGAL en HSC y explorar si HGAL puede contribuir a la linfomagénesis en una etapa de desarrollo anterior a la de células B comprometidas) o ratones Mb1-Cre (enfoque experimental para iniciar la expresión de HGAL en células de linaje B a partir de las primeras etapas de células pro-B y estudiar si HGAL puede contribuir a la linfomagénesis en una etapa de desarrollo anterior a las células B alcanzando la plena madurez) (**Figura 15A**).

Tras la escisión mediada por Cre del Neo-casete STOP, el promotor CAG impulsa la producción de HGAL y eGFP (**Figura 15B**).

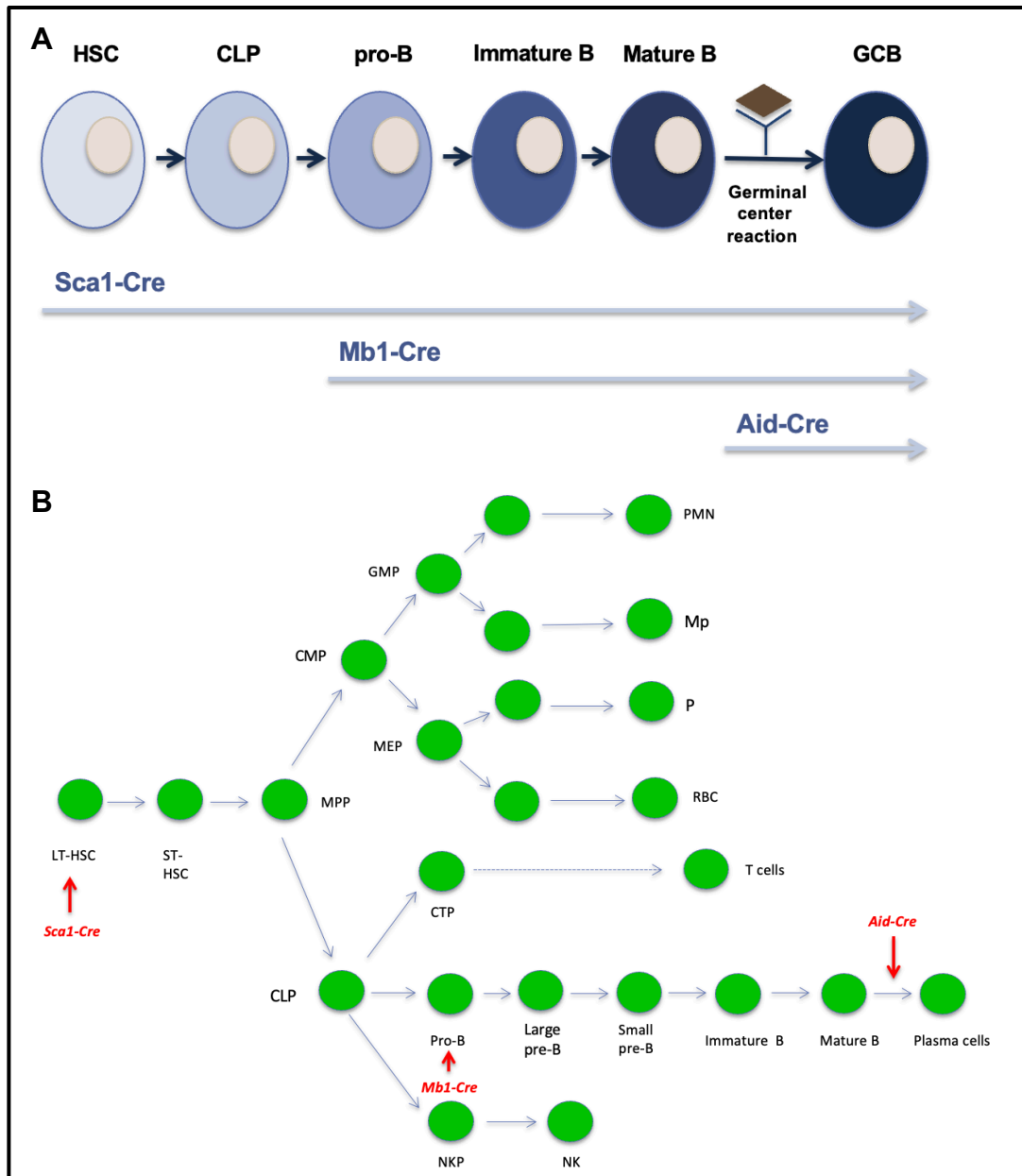


Figura 15. Expresión condicional del gen *HGAL* restringida a diferentes compartimentos hematopoyéticos. (A) El diagrama esquemático representa las etapas de desarrollo celular desde estadios indiferenciados o no comprometidos hasta la formación del centro germinal, a saber: HSC (célula madre hematopoyética), CLP (progenitor linfoide común), pro-B (células pro-B), Imm B (células B inmaduras), Mat B (células B maduras), GCB (célula B del centro germinal). Asimismo, se muestra cada uno de los puntos de desarrollo en los que comienza la expresión condicional de *HGAL*, según el promotor que regula dicha expresión (*Sca1-Cre*, *Mb1-Cre* y *Aid-Cre*; respectivamente) finalizando tras la reacción del centro germinal (CG). (B) El diagrama muestra todos y cada uno de los estadios de desarrollo hematopoyético desde las etapas más indiferenciadas hasta la generación de células plasmáticas, a saber: LT-HSC (célula madre hematopoyética a largo plazo), ST-HSC (células madre hematopoyética a corto plazo), MPP (progenitor multipotente), CMP (progenitor mielóide común), GMP (progenitor granulomonocítico), PMN (polimorfonuclear/granulocito), Mp (población de monocitos), MEP (progenitor eritroide-megacariocítico), P (plaqueta), RBC (eritrocito), CLP (progenitor linfoide común), CTP (progenitor común de células T), NKP (progenitor de células NK), pro-B (células pro-B), Large pre-B (células pre-B grandes), Small pre-B (células pre-B pequeñas), Immature B (células B inmaduras), Mature B (células B maduras), Plasma cells (células plasmáticas). Además, se representa cada una de las etapas de desarrollo en las que comienza la expresión condicional de *HGAL*, reportada por eGFP, según el promotor que regula dicha expresión (*Sca1-Cre*, *Mb1-Cre* y *Aid-Cre*; respectivamente). Elaboración propia.

Usando un análisis de citometría de flujo, la expresión de eGFP no se detectó en ninguna célula hematopoyética en la sangre periférica de ratones *Rosa26^{HGAL}* o ratones *Rosa26^{HGAL}/Aid-Cre* (**Figura 16A**). Este resultado era el esperado, pues la inducción de la expresión de HGAL y GFP en los ratones *Aid-Cre* precisan del inicio de una respuesta inmune y la formación del centro germinal (**Figura 16B**).

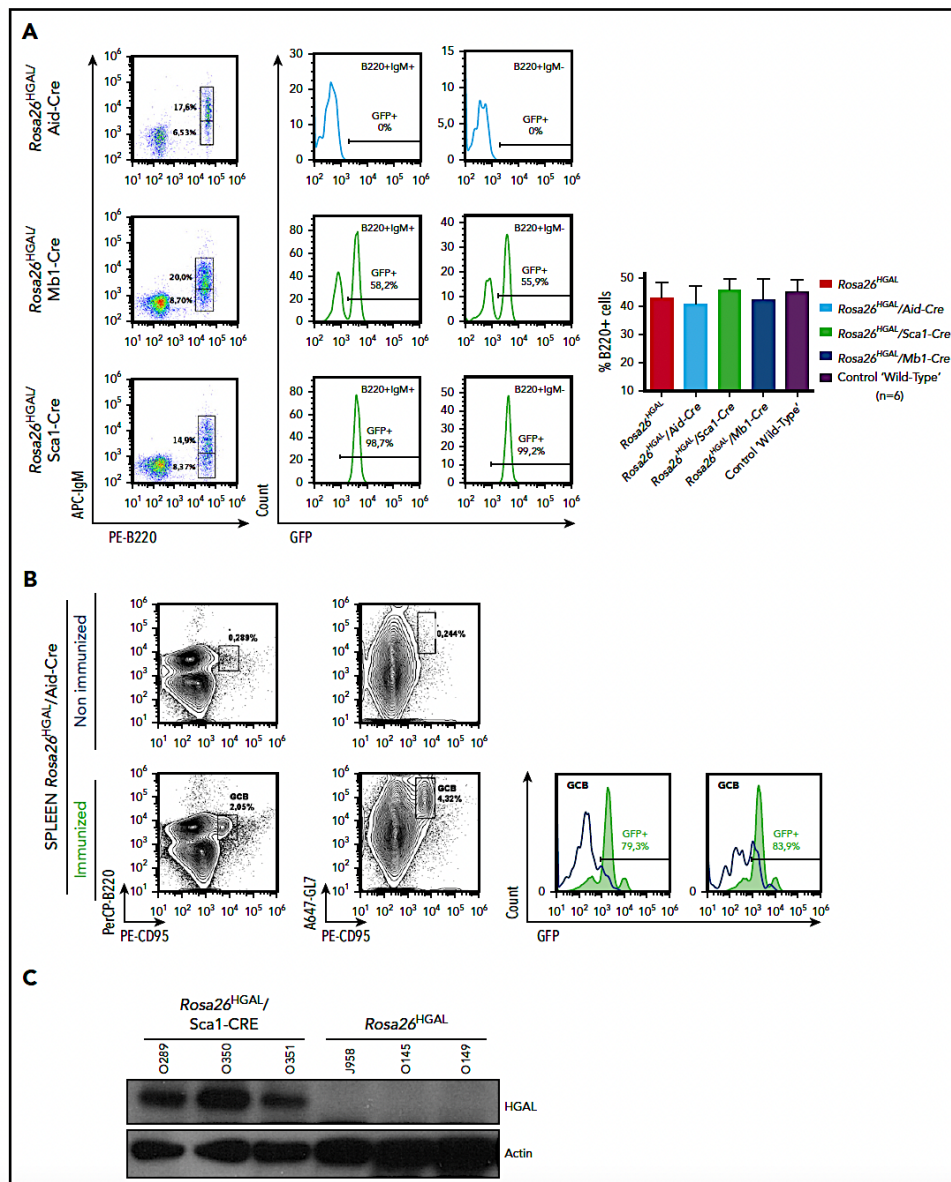


Figura 16. Expresión de GFP y HGAL en ratones *Rosa26^{HGAL}*. (A) Análisis por citometría de flujo de la expresión GFP (HGAL) en células B de sangre periférica en ratones no inmunizados *Rosa26^{HGAL}/Aid-Cre* (n=6), *Rosa26^{HGAL}/Mb1-Cre* (n=6) y *Rosa26^{HGAL}/Sca1-Cre* (n=6) (paneles de la izquierda). Expresión de GFP en células B B220⁺IgM⁺ y B220⁺IgM⁻ (paneles centrales). Gráfico de barras que muestra los porcentajes de células B B220⁺ en sangre periférica de ratones *Rosa26^{HGAL}*, *Rosa26^{HGAL}/Aid-Cre*, *Rosa26^{HGAL}/Sca1-Cre*, *Rosa26^{HGAL}/Mb1-Cre* y ratones WT de control (n=6, para cada uno de los genotipos; panel derecho). No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales. **(B)** Expresión de GFP en el bazo de ratones *Rosa26^{HGAL}/Aid-Cre* antes y después de la inmunización (paneles de la izquierda). La expresión de HGAL y GFP en los ratones *Aid-Cre* requiere el inicio de una respuesta inmune y la formación del centro germinal. Los gráficos muestran la expresión de GFP en células B del centro germinal antes y después de la inmunización (paneles de la derecha). **(C)** Análisis de transferencia por *Western Blot* usando extractos de células B esplénicas de ratones *Rosa26^{HGAL}/Sca1-Cre* y *Rosa26^{HGAL}* (n=3, para cada uno) y los anticuerpos indicados. Elaboración propia.

Sin embargo, los ratones *Rosa26^{HGAL}/Mbl-Cre* mostraban una expresión específica de GFP en células B220⁺ (Figura 16A) y los ratones *Rosa26^{HGAL}/Scal-Cre* expresaban GFP en todas sus células hematopoyéticas (Figura 16A; Figura 17A).

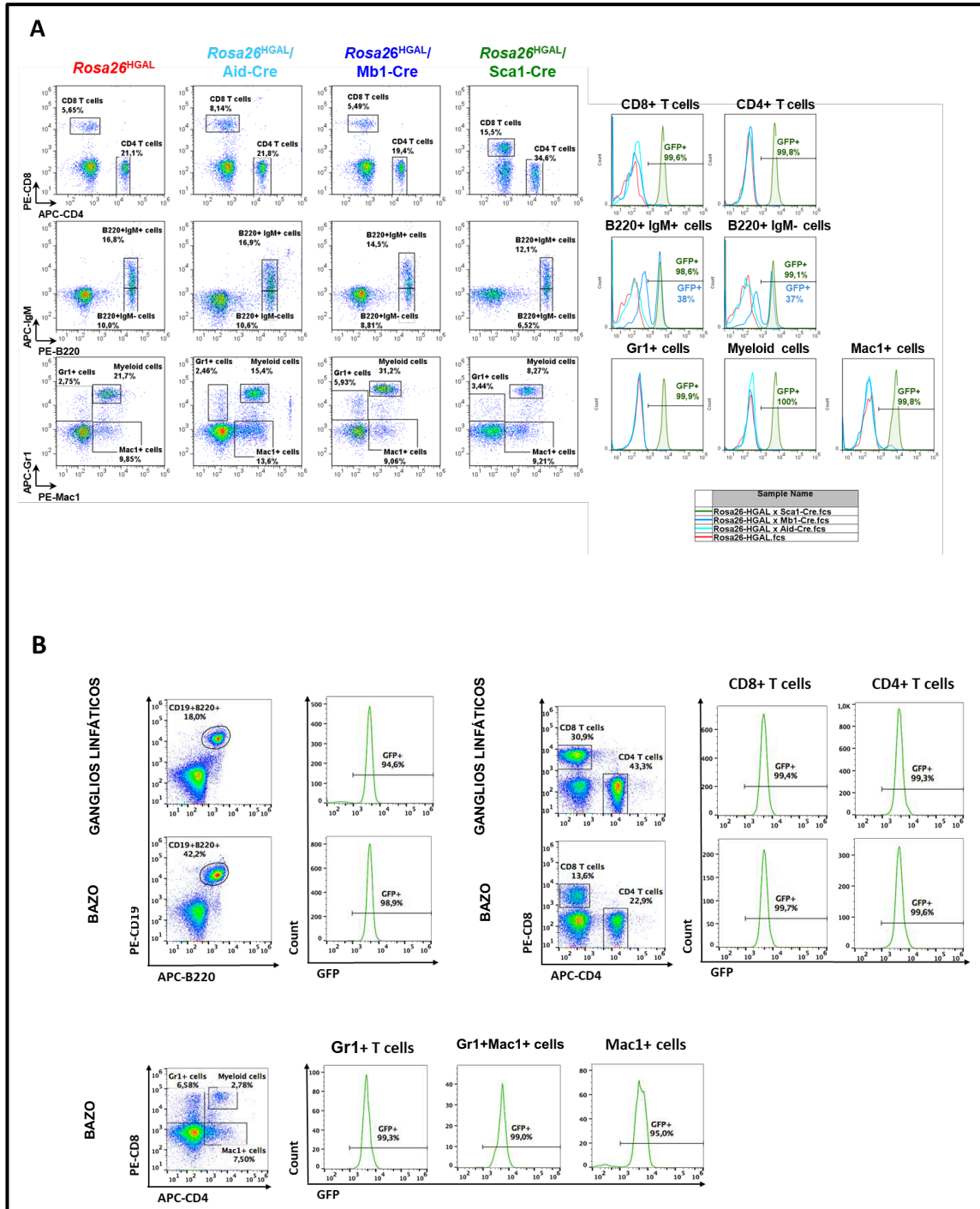


Figura 17. Desarrollo hematopoyético normal en ratones jóvenes *Rosa26^{HGAL}/Aid-Cre*, *Rosa26^{HGAL}/Scal-Cre* y *Rosa26^{HGAL}/Mbl-Cre*. (A) Análisis por citometría de flujo de la sangre periférica de células B, T y mieloides de ratones de 3 meses de edad *Rosa26^{HGAL}/Aid-Cre*, *Rosa26^{HGAL}/Scal-Cre* y *Rosa26^{HGAL}/Mbl-Cre*. Se muestran plots representativos de poblaciones celulares cercanas al seguimiento del marcador GFP para la expresión del transgén *HGAL*, comparados ratones control de la misma edad y camada. (B) Análisis por citometría de flujo de células hematopoyéticas de bazo y ganglios linfáticos de ratones de 3 meses de edad *Rosa26^{HGAL}/Scal-Cre*. Se muestran plots representativos de poblaciones celulares cercanas al seguimiento del marcador GFP para la expresión del transgén *HGAL*, comparados con ratones control de la misma edad y camada. Elaboración propia.

Los animales tuvieron un desarrollo y morfología de los órganos linfoides y una maduración de células B y T, células mieloides y células eritroides completamente normales (**Figura 18**). Confirmamos la expresión de la proteína HGAL en las células B de estos animales por *Western Blot* (ejemplo de ratón *Rosa26^{HGAL}/Sca1-Cre* en la **Figura 16C**).

No se detectó, en cambio, la expresión de HGAL en linajes maduros mieloides, monocitos o células T en los ratones control, WT.

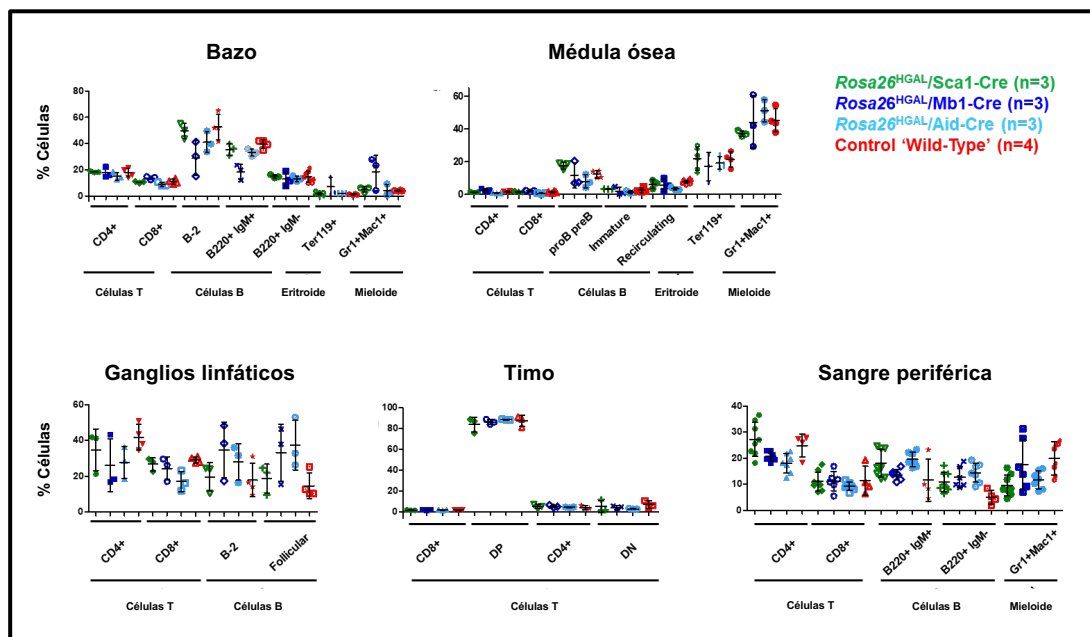


Figura 18. Desarrollo hematopoyético normal en ratones jóvenes según su expresión de HGAL. Porcentajes de las diferentes poblaciones hematopoyéticas en bazo, médula ósea, ganglios linfáticos, timo y sangre periférica de ratones con expresión diferencial de HGAL (*Rosa26^{HGAL}/Sca1-Cre*, n=3-8; *Rosa26^{HGAL}/Mb1-Cre*, n=3-6 y *Rosa26^{HGAL}/Aid-Cre*, n=3-7) comparados con ratones control (WT, n=4) de la misma edad y camada. DP (dobles positivas), DN (dobles negativas). Elaboración propia.

Todos los animales fueron viables y no se observaron muertes en el útero. En comparación con controles de la misma edad, los ratones con una ganancia de función de HGAL no mostraron cambios visibles dentro de los principales compartimentos hematopoyéticos (médula ósea, bazo, timo, sangre periférica y ganglios linfáticos) por citometría de flujo y análisis histológico (**Tabla 2**).

Para dilucidar el papel de HGAL en las respuestas del centro germinal, se procedió a inmunizar ratones *Rosa26^{HGAL}/Aid-Cre*, *Rosa26^{HGAL}/Sca1-Cre* y *Rosa26^{HGAL}/Mb1-Cre* (n=6, para cada genotipo) con eritrocitos de cordero (SRBC) que inician una respuesta de centro germinal por la activación de este.

El análisis por citometría de flujo, pasados 10 días desde la inmunización, mostró un número significativamente mayor (p=0.0088) de células B esplénicas de centro germinal en ratones *Rosa26^{HGAL}/Aid-Cre*, comparado con ratones *Rosa26^{HGAL}/Sca1-Cre*, ratones *Rosa26^{HGAL}/Mb1-Cre* y ratones control *WT* (**Tabla 2; Figura 19A**).

Tabla 2. Número total de células B B200⁺ y porcentaje de células B de centro germinal (GCB) en ratones inmunizados.

n° células (media±SD)	<i>Rosa26^{HGAL}</i> (n=6)	<i>Rosa26^{HGAL}/Aid-Cre</i> (n=6)	<i>Rosa26^{HGAL}/Sca1-Cre</i> (n=6)	<i>Rosa26^{HGAL}/Mb1-Cre</i> (n=6)	Control 'Wild-Type' (n=6)
B220+	135100±14310	162075±26597	184373±16987	132889±12879	171011±9437
GCB	2336±615	5522±1740	2194±1254	1172±528	1156±199
GCB (%)	1,729±0,250	3,407±0,701	1,190±0,103	0,882±0,124	0,676±0,102

La expresión de HGAL en los linfocitos del centro germinal fue confirmada por inmunohistoquímica (**Figura 19A**). Este análisis inmunohistoquímico, utilizando PNA (marcador de células B de centro germinal), puso de manifiesto un aumento en el número y tamaño de los centros germinales en ratones *Rosa26^{HGAL}/Aid-Cre* en comparación con ratones control *WT*, mientras que no hubo ningún cambio significativo en los centros germinales de ratones *Rosa26^{HGAL}/Sca1-Cre* o *Rosa26^{HGAL}/Mb1-Cre* (**Figura 19B**).

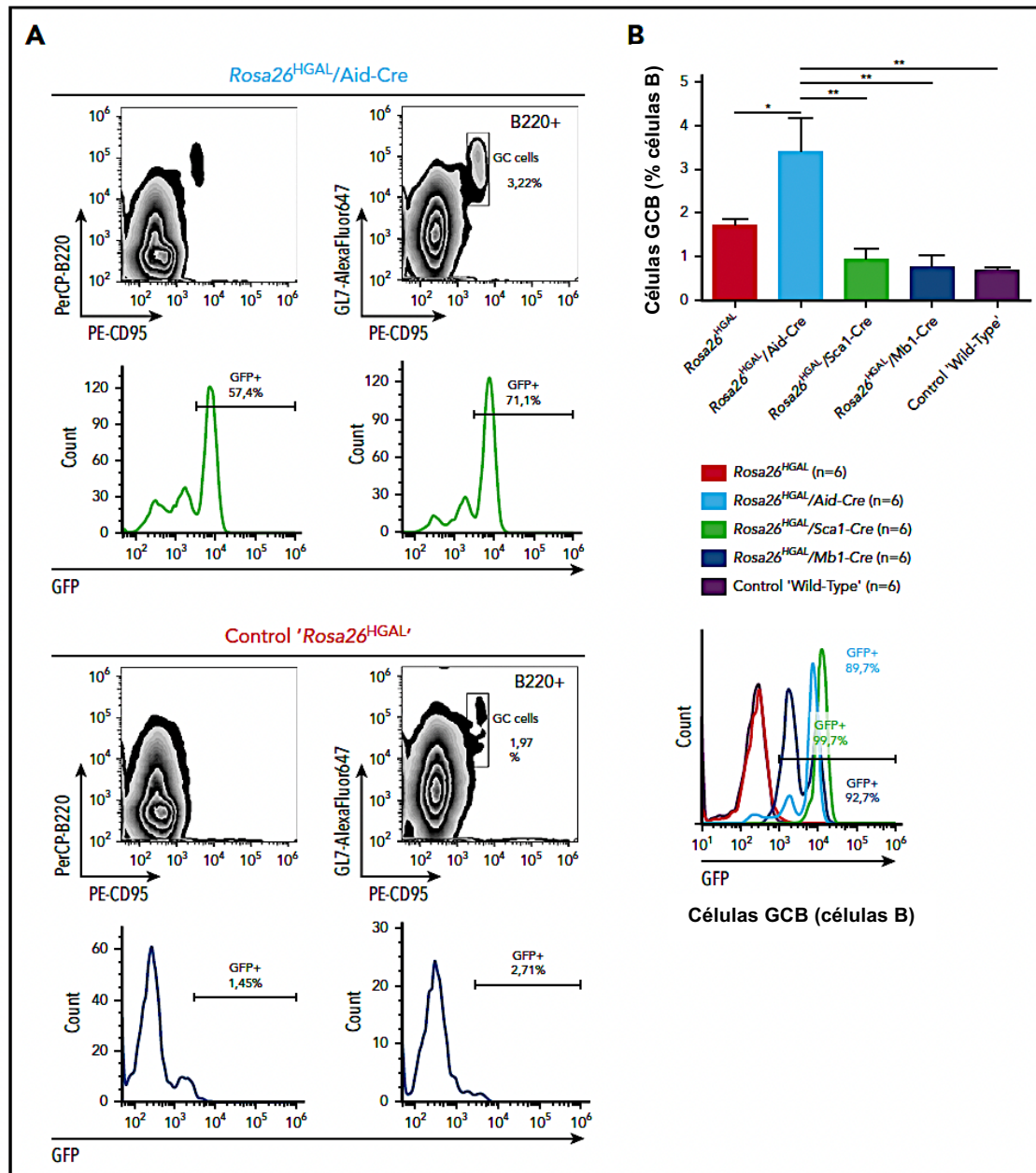


Figura 19. Cuantificación de células B de centro germinal (GCB) en el día 10 tras la inmunización con SRBC. (A) Análisis representativo por citometría de flujo de células B esplénicas de centro germinal marcadas con anticuerpos frente a CD95 y GL7 de un ratón *Rosa26^{HGAL}/Aid-Cre* representativo (paneles superiores) y un ratón *Rosa26^{HGAL}* de control (paneles inferiores). **(B)** Gráfico de barras que muestra el porcentaje de linfocitos GCB dentro de la población B220⁺ seleccionada de ratones *Rosa26^{HGAL}*, *Rosa26^{HGAL}/Aid-Cre*, *Rosa26^{HGAL}/Sca1-Cre*, *Rosa26^{HGAL}/Mb1-Cre* y control *WT* (n=6, para cada genotipo) (panel izquierdo). Gráfico de líneas que muestra la intensidad de GFP en células GCB en cada genotipo (panel derecho). *P<0,05; **P<0,01; prueba de comparación múltiple de Bonferroni (análisis de varianza de un sentido). Elaboración propia.

2. Perfil histopatológico e inmunohistoquímico de modelos murinos con ganancia funcional de HGAL

El examen macroscópico de estos animales reveló una marcada esplenomegalia causada por grandes tumores en todos los animales, independientemente del promotor que controla la expresión de HGAL (**Figura 20**).

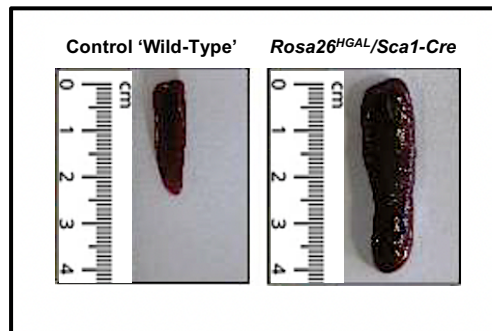


Figura 20. Examen macroscópico del bazo de ratones *Rosa26^{HGAL}/Sca1-Cre* tumorales. Imagen representativa de la esplenomegalia en ratones *Rosa26^{HGAL}/Sca1-Cre* linfomatosos comparados con ratones control 'Wild-Type' de la misma edad. Datos representativos tras el análisis anatomopatológico de ratones *Rosa26^{HGAL}/Sca1-Cre*, n=27. Elaboración propia.

Además, se detectaron tumores generados por el linfoma en varios órganos: hígado y ganglios linfáticos de ratones *Rosa26^{HGAL}/Sca1-Cre*, riñón y páncreas en ratones *Rosa26^{HGAL}/Mbl-Cre* y riñón e hígado de ratones *Rosa26^{HGAL}/Aid-Cre* (**Figura 21-25**).

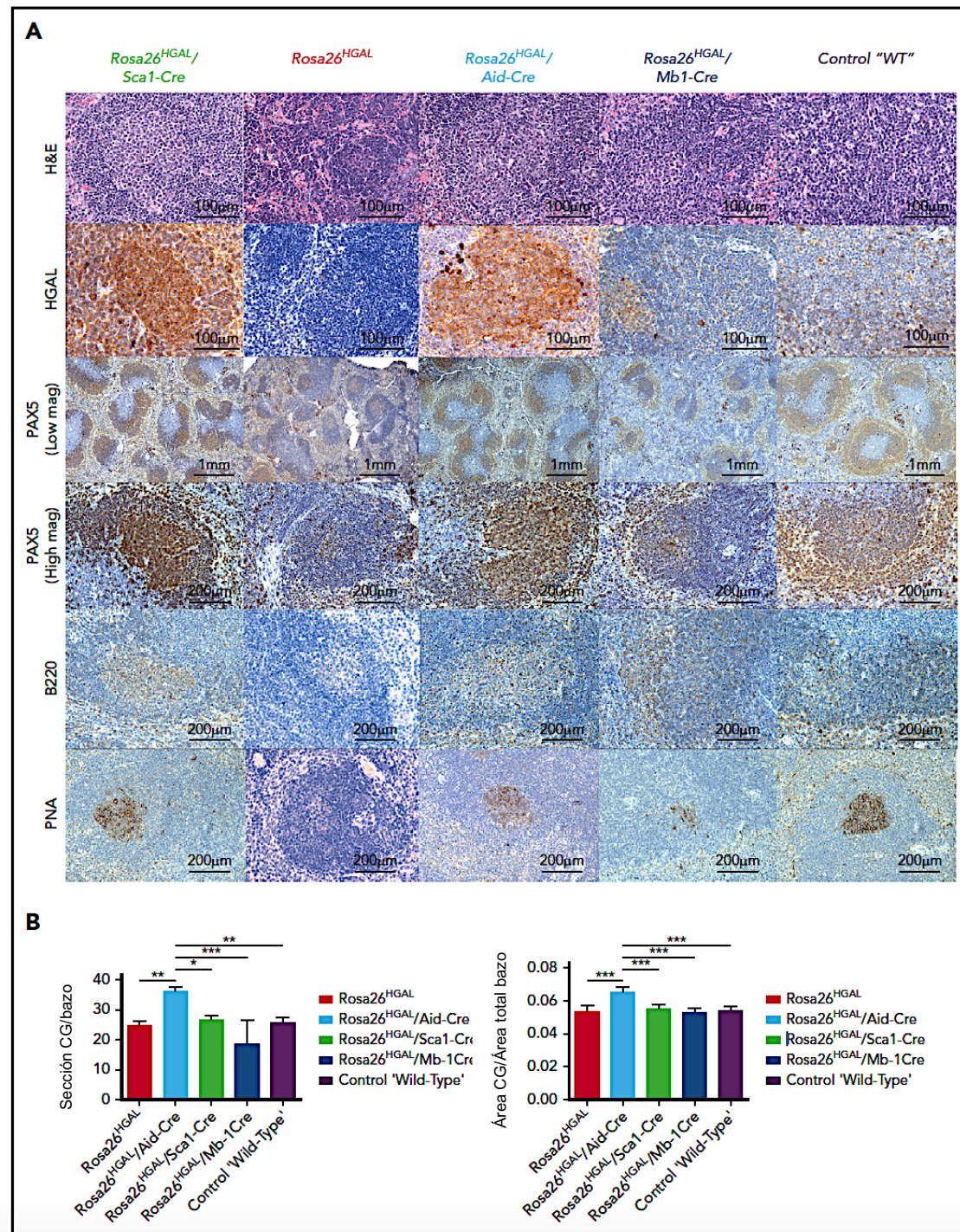


Figura 21. Análisis inmunohistoquímico de bazo el día 10 después de la inmunización con SRBC. (A) Tinciones representativas de hematoxilina y eosina (HE), HGAL, PAX5, B220 y PNA de secciones seriadas de bazo de ratones *Rosa26^{HGAL}*, *Rosa26^{HGAL}/Aid-Cre*, *Rosa26^{HGAL}/Sca1-Cre*, *Rosa26^{HGAL}/Mb1-Cre* y *WT*. HGAL se expresa fuertemente en linfocitos GCB de ratones *Rosa26^{HGAL}/Aid-Cre* y *Rosa26^{HGAL}/Sca1-Cre*, con expresión más débil en animales *Rosa26^{HGAL}/Mb1-Cre* debido al menor tamaño de los GC. **(B)** Cuantificación del número (panel izquierdo) y área (panel derecho) de centros GC teñidos con PNA en ratones *Rosa26^{HGAL}*, *Rosa26^{HGAL}/Aid-Cre*, *Rosa26^{HGAL}/Sca1-Cre*, *Rosa26^{HGAL}/Mb1-Cre* y *WT* (n=6 cada uno). Los datos representados son la media ± desviación estándar. *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001, prueba de comparación múltiple de Bonferroni. (análisis de varianza de 1 vía). Elaboración propia.

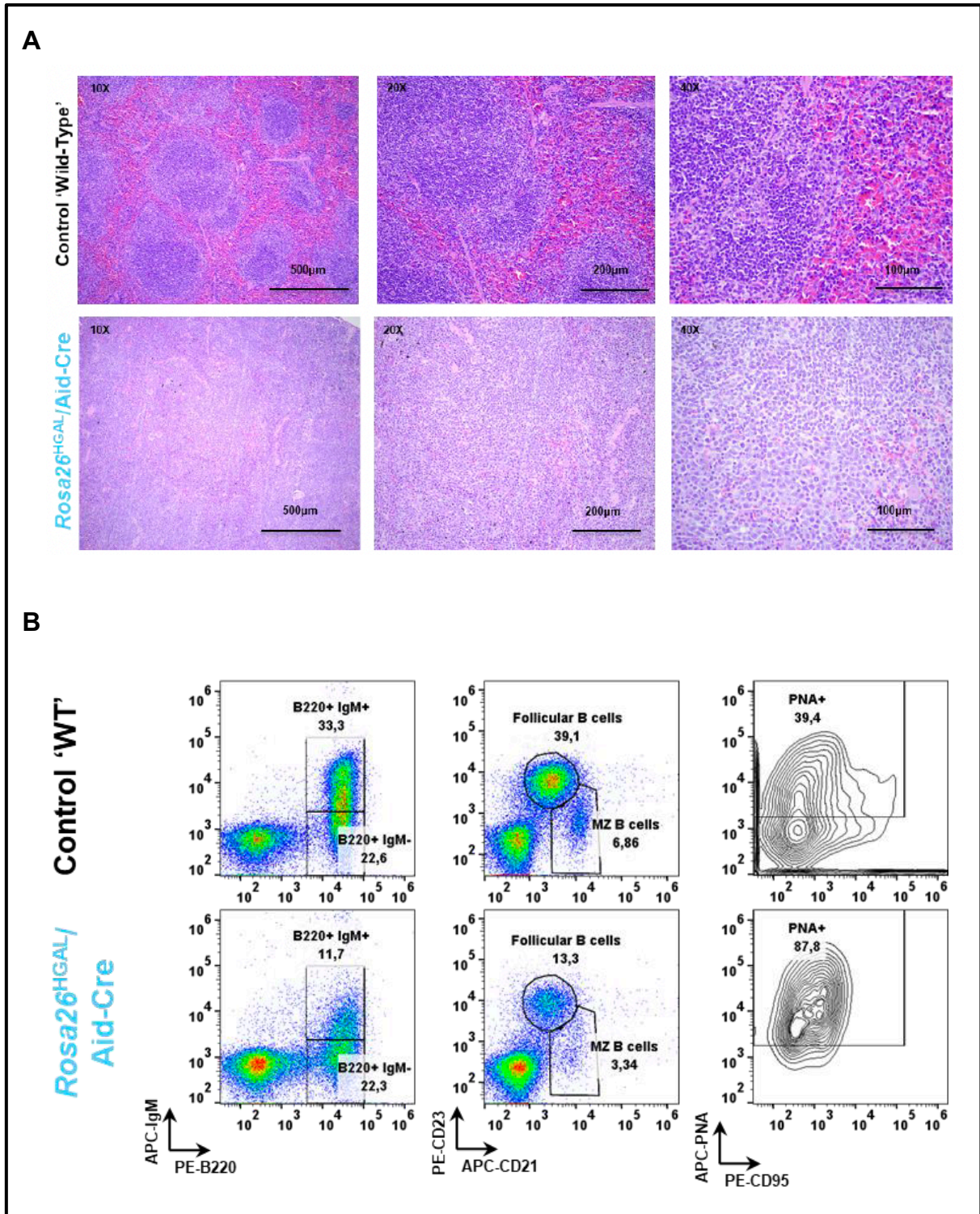


Figura 22. Linfomas de células B en ratones *Rosa26^{HGAL}/Aid-Cre*. (A) Tinción HE de linfomas de células B *Rosa26^{HGAL}/Aid-Cre* mostrando la pérdida de arquitectura esplénica normal. Se muestran tejidos de un control *WT* de la misma camada como referencia. Se presentan imágenes representativas de tres réplicas. Las barras de escala representan 500µm (=10X) para paneles grandes, 200 µm (=20X) y 100 µm (=40X). (B) Análisis de citometría de flujo de células B tumorales esplénicas de ratones *Rosa26^{HGAL}/Aid-Cre*. Se muestra la misma tinción de un control *WT* de la misma camada como referencia. Elaboración propia.

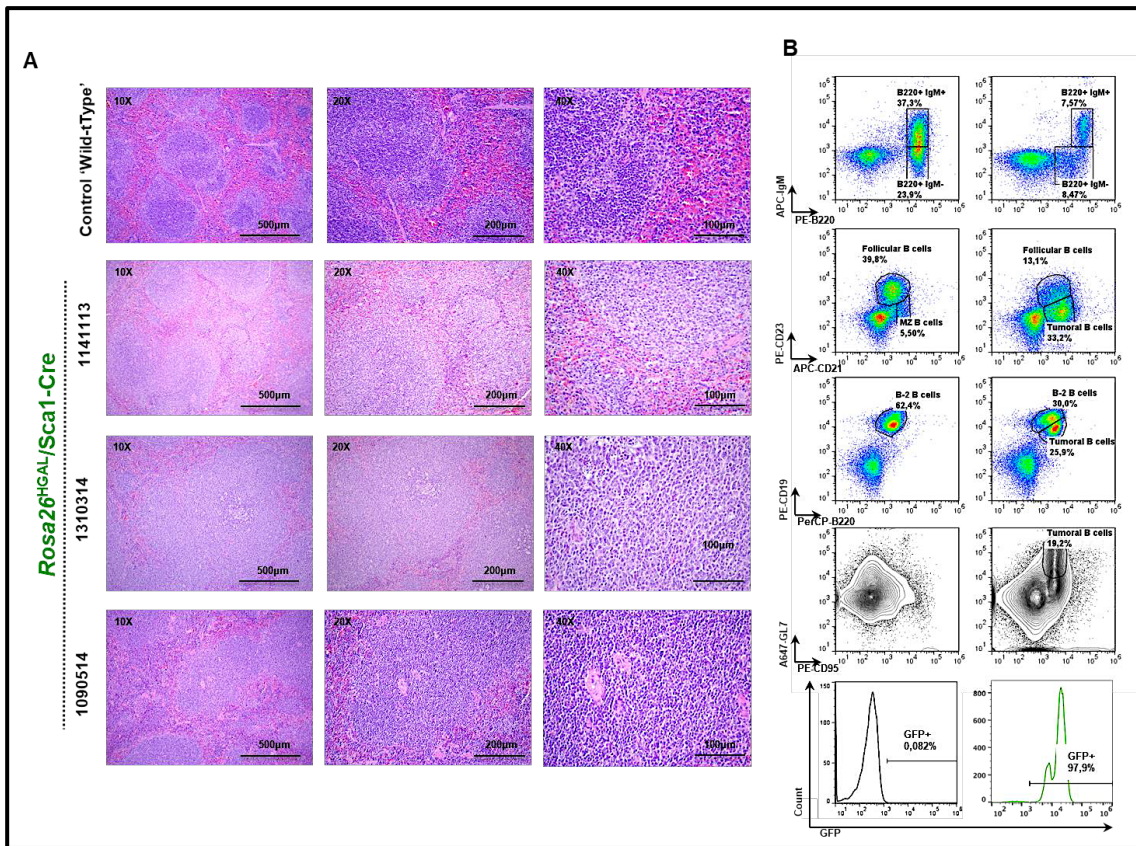


Figura 23. Linfomas de células B en ratones *Rosa26^{HGAL}/Sca1-Cre*. (A) Tinción HE de linfomas de células B *Rosa26^{HGAL}/Sca1-Cre* mostrando la pérdida de arquitectura esplénica normal. Se muestran tejidos de un control *WT* de la misma camada como referencia. Se presentan imágenes representativas de tres réplicas. Las barras de escala representan 500µm (=10X) para paneles grandes, 200 µm (=20X) y 100 µm (=40X). (B) Análisis de citometría de flujo de células B tumorales esplénicas de ratones *Rosa26^{HGAL}/Sca1-Cre*. Se muestra la misma tinción de un control *WT* de la misma camada como referencia. Elaboración propia.

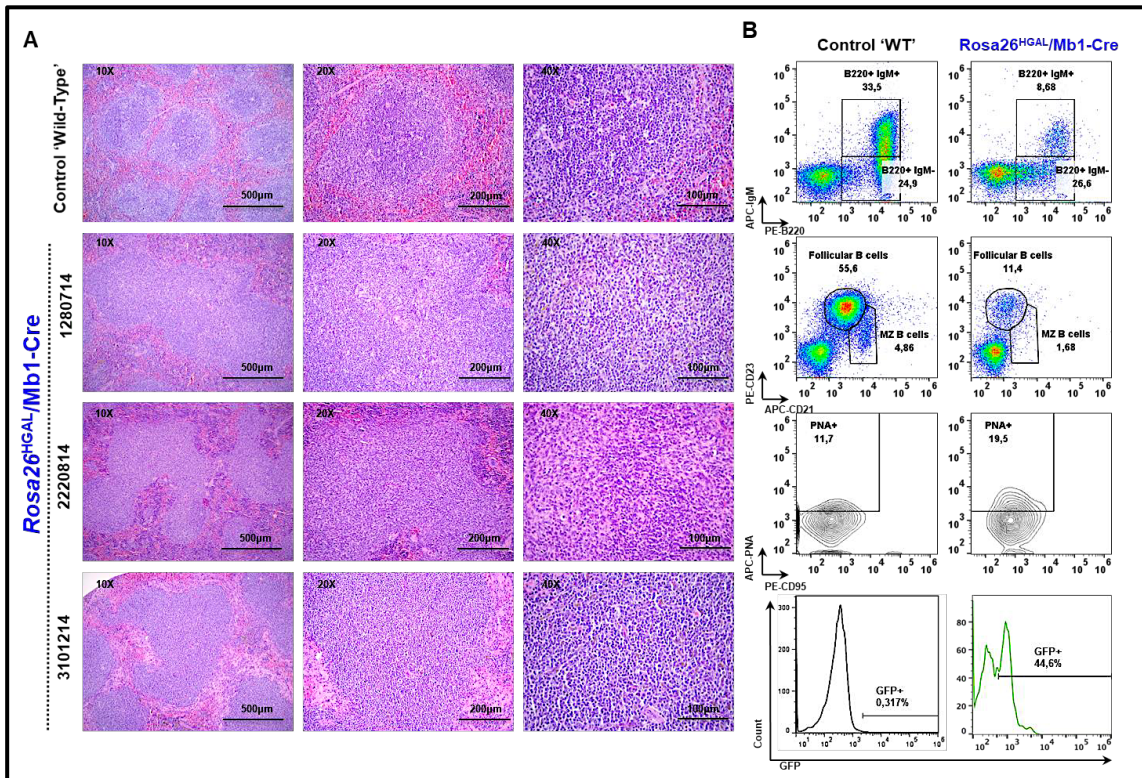


Figura 24. Linfomas de células B en ratones *Rosa26^{HGAL}/Mb1-Cre*. (A) Tinción HE de linfomas de células B *Rosa26^{HGAL}/Mb1-Cre* mostrando la pérdida de arquitectura esplénica normal. Se muestran tejidos de un control *WT* de la misma camada como referencia. Se presentan imágenes representativas de tres réplicas. Las barras de escala representan 500µm (=10X) para paneles grandes, 200 µm (=20X) y 100 µm (=40X). **(B)** Análisis de citometría de flujo de células B tumorales esplénicas de ratones *Rosa26^{HGAL}/Mb1-Cre*. Se muestra la misma tinción de un control *WT* de la misma camada como referencia. Elaboración propia.

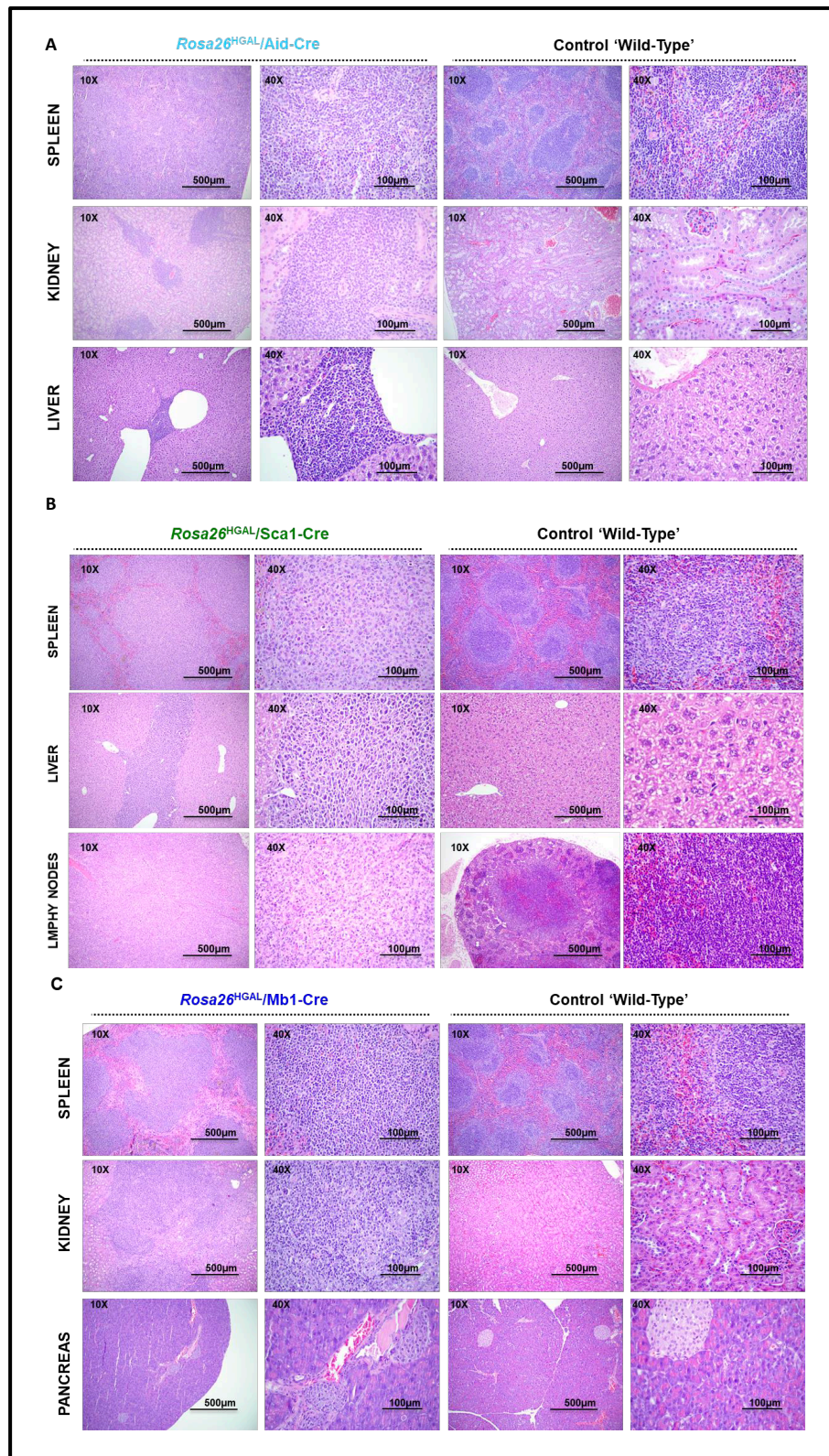


Figura 25. Linfomas de células B en ratones con expresión condicional de HGAL. La tinción con hematoxilina y eosina (HE) revela la infiltración de células tumorales en distintos órganos de ratones *Rosa26^{HGAL/Aid-Cre}*, *Rosa26^{HGAL/Scal-Cre}*, *Rosa26^{HGAL/Mb1-Cre}* comparados con un ratón control *WT* como referencia. **(A)** HE de Bazo, riñón e hígado de ratón *Rosa26^{HGAL/Aid-Cre}*; **(B)** HE de bazo, hígado y ganglios linfáticos de ratón *Rosa26^{HGAL/Scal-Cre}* y **(C)** HE de bazo, riñón y páncreas de ratón *Rosa26^{HGAL/Mb1-Cre}*. La barra de escala representa 500 μm (=10X) para 197 paneles grandes y 100 μm (=40X). Elaboración propia.

Histológicamente, los tumores exhibieron infiltración nodular y difusa de los órganos afectados por grandes células linfoides pleomórficas que fueron positivas para B220, PAX5, HGAL, PNA e IRF4.

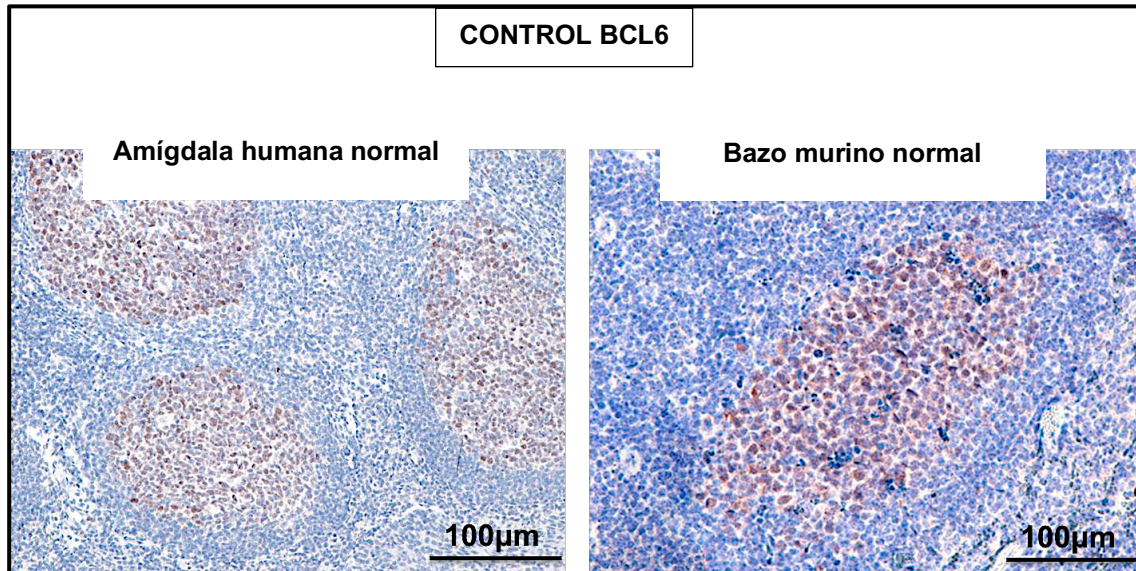


Figura 26. Tinción IHC de BCL6 de amígdala humana sana y bazo murino *WT* inmunizado. Se usaron cortes de amígdala humana¹¹⁷ y bazo de ratón *WT* como controles positivos para la tinción IHC de BCL6. Los ratones inmunizados fueron sacrificados tras 10 días de estimulación con SRBC. La barra de escala representa 100µm (=40X). Elaboración propia.

Sin embargo, estas mismas células fueron negativas para BCL6 y CD3, consistente con linfomas de células B grandes con origen en células B de centro germinal (PNA⁺) (**Figura 26; Figura 25C**).

3. Caracterización de LCGBD asociado a sobreexpresión de HGAL

3.1. Desarrollo de LCGBD en los grupos experimentales

Se analizaron, tanto la supervivencia a largo plazo como el desarrollo de linfomas, de ratones *Rosa26^{HGAL}/Scal-Cre* (n=27), *Rosa26^{HGAL}/Mbl-Cre* (n=25) y *Rosa26^{HGAL}/Aid-Cre* (n=11).

Aquellos ratones con ganancia funcional de HGAL tuvieron una supervivencia global significativamente menor desde el punto de vista estadístico en comparación con los controles WT: *Rosa26^{HGAL}/Scal-Cre* frente a WT, $P < 0,0001$; *Rosa26^{HGAL}/Mbl-Cre* frente a WT, $P < 0,00248$; *Rosa26^{HGAL}/Aid1-Cre* frente a WT, $P < 0,0062$; prueba de rango logarítmico. El 90% de los ratones con ganancia funcional de HGAL estaban vivos a los 15 meses mientras que todos los ratones sin ganancia de HGAL estaban vivos en ese periodo de tiempo (**Figura 27A**).

De todas las cohortes experimentales, 8 ratones *Rosa26^{HGAL}/Scal-Cre* (30 %), 3 ratones *Rosa26^{HGAL}/Mbl-Cre* (12 %) y 2 ratones *Rosa26^{HGAL}/Aid-Cre* (18%) desarrollaron linfoma a partir de los 13 meses (**Figura 27B**) y tenían una supervivencia global más corta ($p=0,0054$).

Los ratones *Rosa26^{HGAL}/Scal-Cre* que desarrollaron linfoma tenían una supervivencia más acortada que los ratones WT ($P=0,0088$), pero no se encontraron diferencias en otras cepas de ratones, probablemente debido a la pequeña cantidad de animales con linfoma.

Por tanto, los resultados evidencian que la ganancia funcional de HGAL, por su sobreexpresión condicional, merma la supervivencia global y específica a largo plazo, sobre todo a partir de los 15 meses y desencadena el desarrollo de linfomas celulares B murinos de tipo LCGBD.

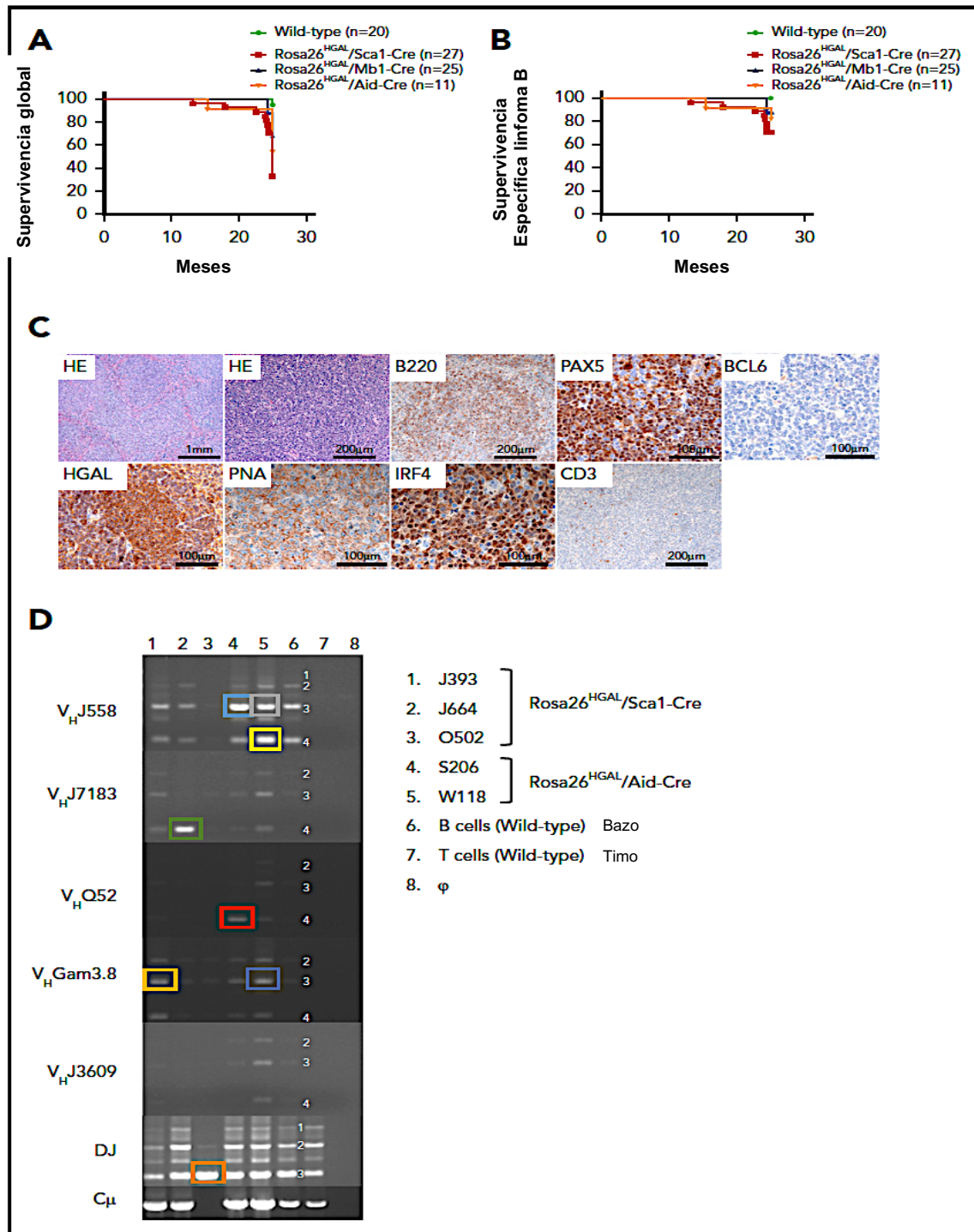


Figura 27. Linfomas de células B en ratones *Rosa26^{HGAL}*. (A) Supervivencia global de ratones *Rosa26^{HGAL}/Sca1-Cre*, ratones *Rosa26^{HGAL}/Mb1-Cre* y *Rosa26^{HGAL}/Aid-Cre* con una esperanza de vida significativamente más corta en comparación con ratones *WT* de la misma camada, a saber: *Rosa26^{HGAL}/Sca1-Cre* frente a *WT*, $P < 0,0001$; *Rosa26^{HGAL}/Mb1-Cre* frente a *WT*, $P < 0,00248$; *Rosa26^{HGAL}/Aid1-Cre* frente a *WT*, $P < 0,0062$; prueba de rango logarítmico. Todos los genotipos experimentales vivos fueron sacrificados por eutanasia a los 24 meses, basado en el diseño experimental (ver ‘Material y métodos: 1. Generación de cepas de ratón’). (B) La supervivencia específica de linfoma B de ratones *Rosa26^{HGAL}/Sca1-Cre*, *Rosa26^{HGAL}/Mb1-Cre* y *Rosa26^{HGAL}/Aid-Cre* con una esperanza de vida significativamente más corta para ratones *Rosa26^{HGAL}/Sca1-Cre* en comparación con ratones *WT* de la misma camada ($P < 0,0088$, prueba de rango logarítmico). (C) Imágenes representativas de ratones *Rosa26^{HGAL}/Sca1-Cre*. Se muestran nódulos esplénicos de células pleomórficas grandes que expresan B220, PAX5 (marcador de células B), HGAL, PNA (marcador GCB) e IRF4 (GC tardío o marcador post-GC) pero no BCL6 (marcador GCB) y CD3 (marcador de células T) (hematoxilina y eosina) (HE); aumento original X400). (D) Todos los linfomas de células B fueron clonales, confirmado por PCR de la cadena pesada de la inmunoglobulina. Este análisis de reordenamientos del gen BCR fue realizado en bazo infiltrado de ratones enfermos *Rosa26^{HGAL}/Sca1-Cre* y *Rosa26^{HGAL}/Aid-Cre*. Las células B aisladas del bazo de ratones sanos y purificadas sirvieron como control positivo. Las células T aisladas del timo de ratones sanos y purificadas sirvieron como control negativo. Las muestras esplénicas de linfoma presentan un aumento de la clonalidad dentro de su repertorio BCR (indicado por el número de código de cada ratón analizado). Los recuadros coloreados indican bandas clonales de genes de inmunoglobulina en diferentes ratones. Elaboración propia.

3.2. Perfil de expresión génica de las muestras tumorales

Para analizar exhaustivamente el efecto transcriptómico de HGAL en linfocitos y linfomas no malignos, realizamos un análisis de expresión génica utilizando bazos de ratones control WT adultos de la misma camada (n=4); bazos no tumorales de ratones *Rosa26^{HGAL}/Sca1-Cre* (n=3), *Rosa26^{HGAL}/Mb1-Cre* (n=5) y *Rosa26^{HGAL}/Aid-Cre* (n=4) y bazos tumorales de ratones *Rosa26^{HGAL}/Sca1-Cre* (n=4) con LCGBD.

En los análisis supervisados empleando el análisis de significación de *microarrays* con un FDR del 10%, identificamos 226 genes que presentaban una expresión significativamente diferente, en esplenocitos B, entre ratones linfomatosos *Rosa26^{HGAL}/Sca1-Cre* y controles WT de la misma camada (**Figura 28A**). Hay que destacar, que el GSEA mostró un enriquecimiento significativo en genes regulados positivamente en los linfomas LCGBD. (GSEA FDR q=0,000; **Figura 28B**), así como genes diana MYC (GSEA FDR q=0.000; **Figura 28C**).

Entre los genes diferencialmente expresados entre el linfoma y los esplenocitos B normales, observamos una sobreexpresión del regulador de la señalización de proteína G1 (RGS1) y de RAB10, miembros de la familia de oncogenes RAS. Usando el mismo conjunto de genes que fue capaz de discriminar entre esplenocitos B de ratones *Rosa26^{HGAL}/Sca1-Cre* y controles WT de la misma camada, se observaron notables diferencias en la expresión entre los esplenocitos B de ratones control WT y los no malignos de *Rosa26^{HGAL}/Sca1-Cre*, *Rosa26^{HGAL}/Mb1-Cre* y *Rosa26^{HGAL}/Aid-Cre*, mientras que las muestras individuales de esplenocitos de animales con diferentes promotores, reguladores de la expresión de HGAL, siempre se agrupaban juntas (**Figura 28E**).

La diferencia en la expresión de estos genes varió según el promotor utilizado para expresar HGAL, con la menor cantidad de cambios observados entre esplenocitos B de ratones *Rosa26^{HGAL}/Aid-Cre* y controles WT de la misma camada. En esta misma línea, la mayoría de los cambios observados se encuentran entre los esplenocitos B de ratones *Rosa26^{HGAL}/Mb1-Cre* y WT.

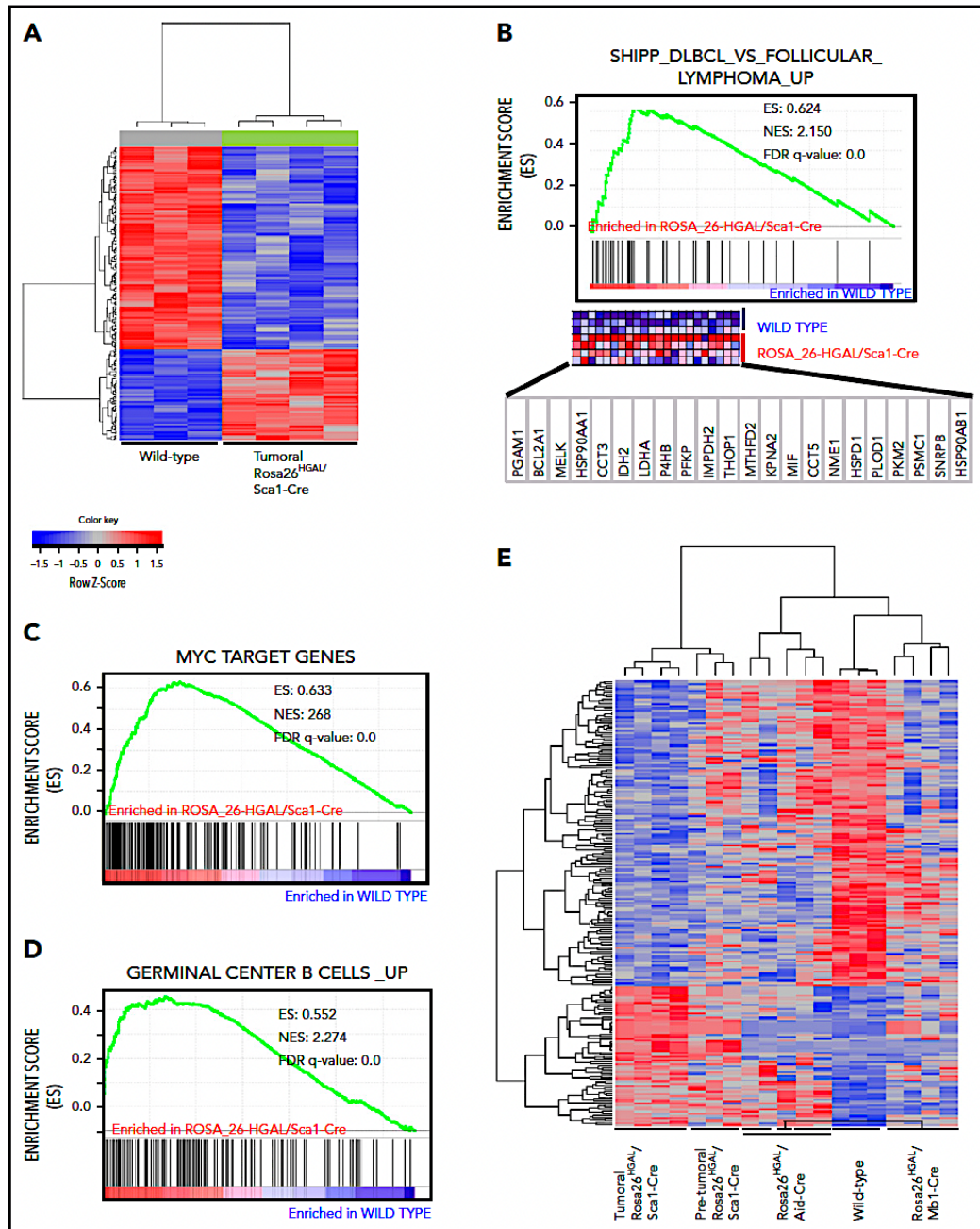


Figura 28. Identidad molecular de células tumorales en ratones $Rosa26^{HGAL}/Sca1-Cre$. (A) Heatmap de genes significativamente inducidos o reprimidos en tumores esplénicos $Rosa26^{HGAL}/Sca1-Cre$ (n=4) y bazos control WT (n=3) clasificados por 226 genes/conjuntos de sondas (FDR=0,101) que se expresan de manera diferencial entre tumores y bazos control (WT). Cada fila representa un gen separado y cada columna indica una muestra separada de ARN mensajero (ARNm). El nivel de expresión de cada gen en cada muestra se representa mediante una escala de color rojo-azul (Los genes inducidos se muestran en rojo y los genes reprimidos están en azul). (B-D) GSEA de las firmas transcripcionales dentro de los tumores esplénicos en comparación con el bazo de ratones WT control de la misma camada. Los datos de expresión génica de los tumores $Rosa26^{HGAL}/Sca1-Cre$ mostraron un enriquecimiento significativo en los genes regulados positivamente en los linfomas foliculares (GSEA FDR q valor=0,000)⁴⁵ tal y como se describe en *Shipp et al.* (B), enriquecimiento en genes diana MYC (GSEA FDR q valor=0,000) (C) y enriquecimiento significativo en genes expresados en GCB normales (GSEA FDR q valor=0,000) (D). (E) Heatmap de genes significativamente inducidos o reprimidos dentro de tumores esplénicos $Rosa26^{HGAL}/Sca1-Cre$ (n=4), bazos pretumorales $Rosa26^{HGAL}/Sca1-Cre$ (n=3), bazos $Rosa26^{HGAL}/Mb1-Cre$ (n=5), bazos $Rosa26^{HGAL}/Aid-Cre$ (n=4) y bazos WT (n=3) clasificados por 226 genes/conjuntos de sondas (FDR=0,101) que se expresan diferencialmente entre los tumores esplénicos $Rosa26^{HGAL}/Sca1-Cre$ y los bazos WT. Cada fila representa un gen separado y cada columna denota una muestra de ARNm separado. El nivel de expresión de cada gen en cada muestra se representa mediante una escala de color rojo-azul (los genes inducidos se muestran en rojo y los genes reprimidos se muestran en azul). NES, puntuación de enriquecimiento normalizado. Elaboración propia.

Un análisis supervisado, utilizando análisis de significación de microarrays a un FDR del 10%, identificó 654 genes con una expresión significativamente diferente entre esplenocitos B no malignos de ratones *Rosa26^{HGAL}/Mb1-Cre* y los esplenocitos WT de la misma camada (Figura 29).

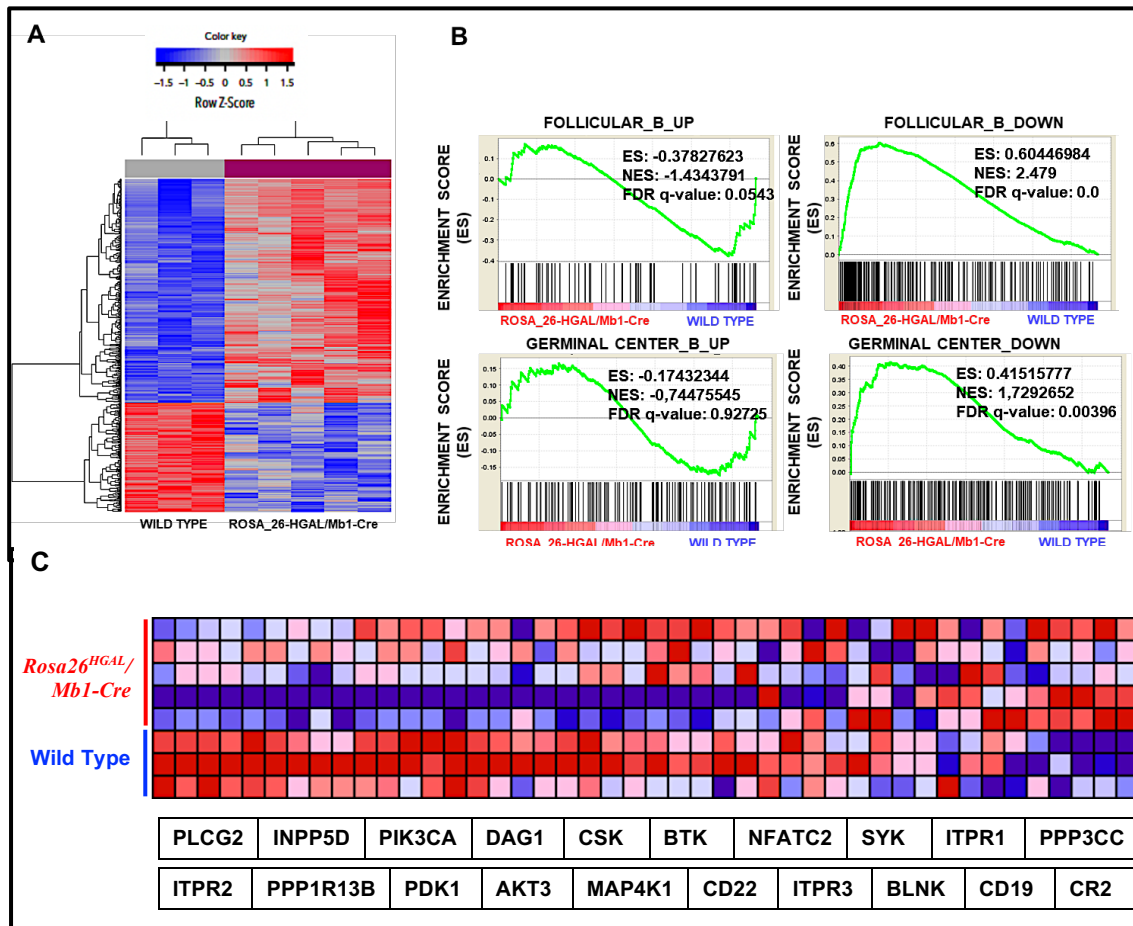


Figura 29. Identidad molecular de esplenocitos *Rosa26^{HGAL}/Mb1-Cre*. (A) *Heatmap* de genes significativamente inducidos o reprimidos en bazo *Rosa26^{HGAL}/Mb1-Cre* (n=5) y *WT* (n=3) clasificados según 654 genes/conjuntos de sondas (FDR=0,101), que son expresados diferencialmente entre ellos. Cada fila representa un gen separado y cada columna indica una muestra de ARNm separada. El nivel de expresión de cada gen en cada muestra se representa mediante una escala de color rojo-azul (los genes inducidos se muestran en rojo y los genes reprimidos en azul). (B) Análisis de enriquecimiento del conjunto de genes regulados positiva y negativamente en células B foliculares normales y células B del centro germinal en bazo *Rosa26^{HGAL}/Mb1-Cre*. El GSEA muestra un enriquecimiento de los genes que están regulados a la baja en las células B normales GC y foliculares en los bazo *Rosa26^{HGAL}/Mb1-Cre*. (C) Los datos de expresión génica de esplenocitos *WT* revelaron un enriquecimiento significativo en los genes involucrados en la vía de señalización del BCR (GSEA FDR q valor=0,001). Elaboración propia.

En esta misma línea de trabajo, un análisis similar en un FDR al 15% identificó tan solo 91 genes con expresión significativamente diferente entre los esplenocitos B no malignos de ratones *Rosa26^{HGAL}/Aid-Cre* y *WT* de la misma camada (Figura 30).

Un conjunto de genes más pequeño con una expresión significativamente diferente entre los esplenocitos B no malignos de ratones *Rosa26^{HGAL}/Aid-Cre* y WT de la misma camada sería plausible, pues HGAL se expresa únicamente tras la formación del centro germinal en estos animales.

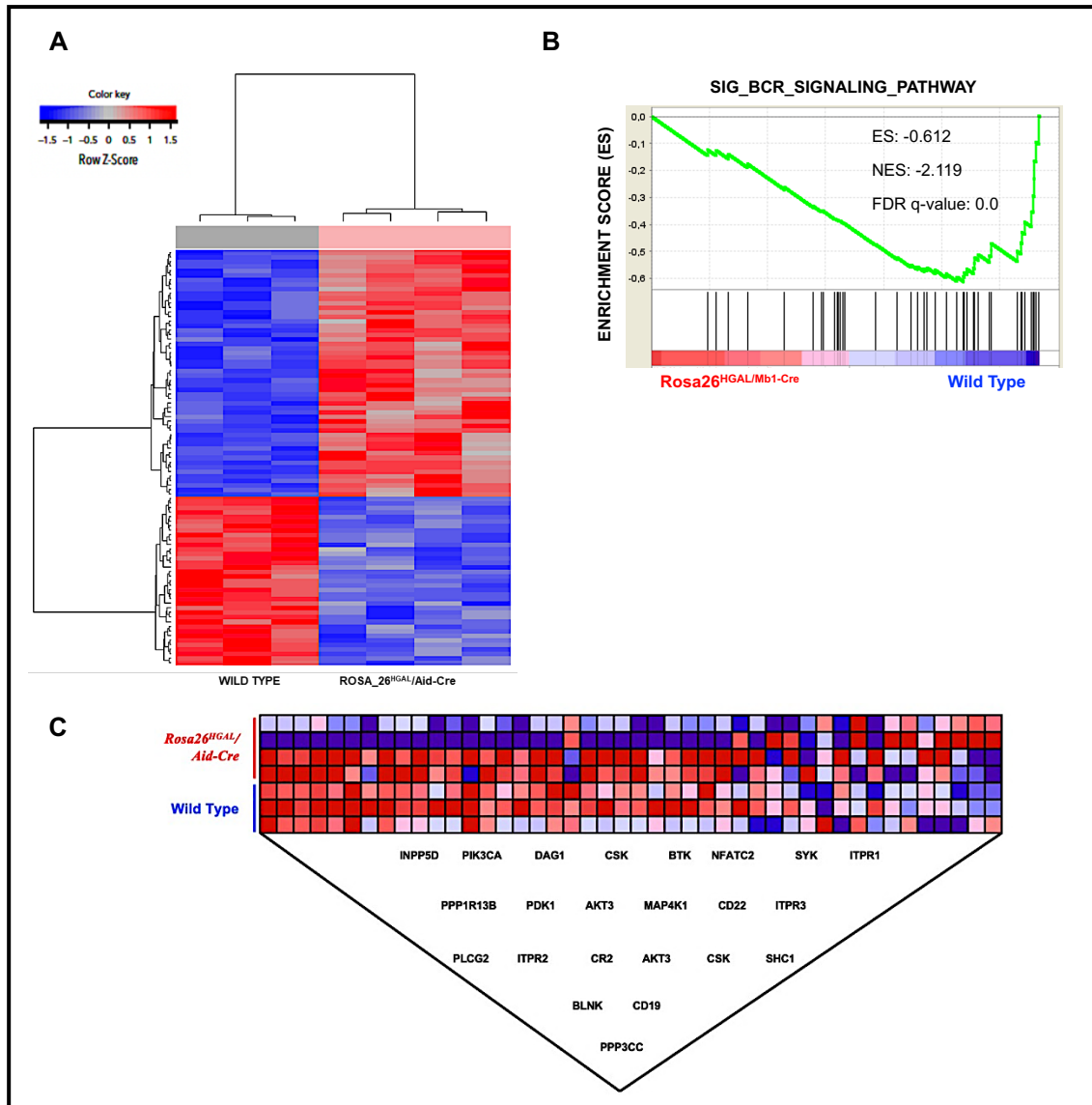


Figura 30. Identidad molecular de esplenocitos *Rosa26^{HGAL}/Aid-Cre*. (A) Heatmap de genes significativamente inducidos o reprimidos en bazo *Rosa26^{HGAL}/Aid-Cre* (n=4) y WT (n=3) clasificados de acuerdo con 91 genes/conjuntos de sondas (FDR=0.15) que se expresan diferencialmente entre ellos. Cada fila representa un gen separado y cada columna indica una muestra de ARNm separada. El nivel de expresión de cada gen en cada muestra se representa mediante una escala de color rojo-azul (los genes activados se muestran en rojo y los genes regulados a la baja en azul). (B-C) Análisis de enriquecimiento del conjunto de genes regulados positiva y negativamente en esplenocitos B *Rosa26^{HGAL}/Aid-Cre*. Los datos de expresión génica de esplenocitos WT revelaron un enriquecimiento significativo en los genes involucrados en la vía de señalización del BCR (GSEA FDR q valor=0,000). Elaboración propia.

El GSEA de genes expresados diferencialmente entre esplenocitos B de las cepas generadas en comparación con ratones control de la misma camada demostró cambios específicos y generalizados en los tres modelos animales (**Figura 28E**).

Se observan enriquecimientos en genes comunes a los 3 modelos, a saber: señalización mTORC1, respuesta de interferón, dianas E2F y señalización de IL-6 /JAK/STAT3¹⁴¹, entre otros (**Figura 31D**). Las dianas MYC^{20,23,61,95,102,103,190} aparecían enriquecidas en esplenocitos de animales *Rosa26^{HGAL}/Sca1-Cre* y *Rosa26^{HGAL}/Aid-Cre* y, por ejemplo, los objetivos p53¹⁰⁰ solo se enriquecieron en esplenocitos de animales *Rosa26^{HGAL}/Sca1-Cre* (**Figura 31**).

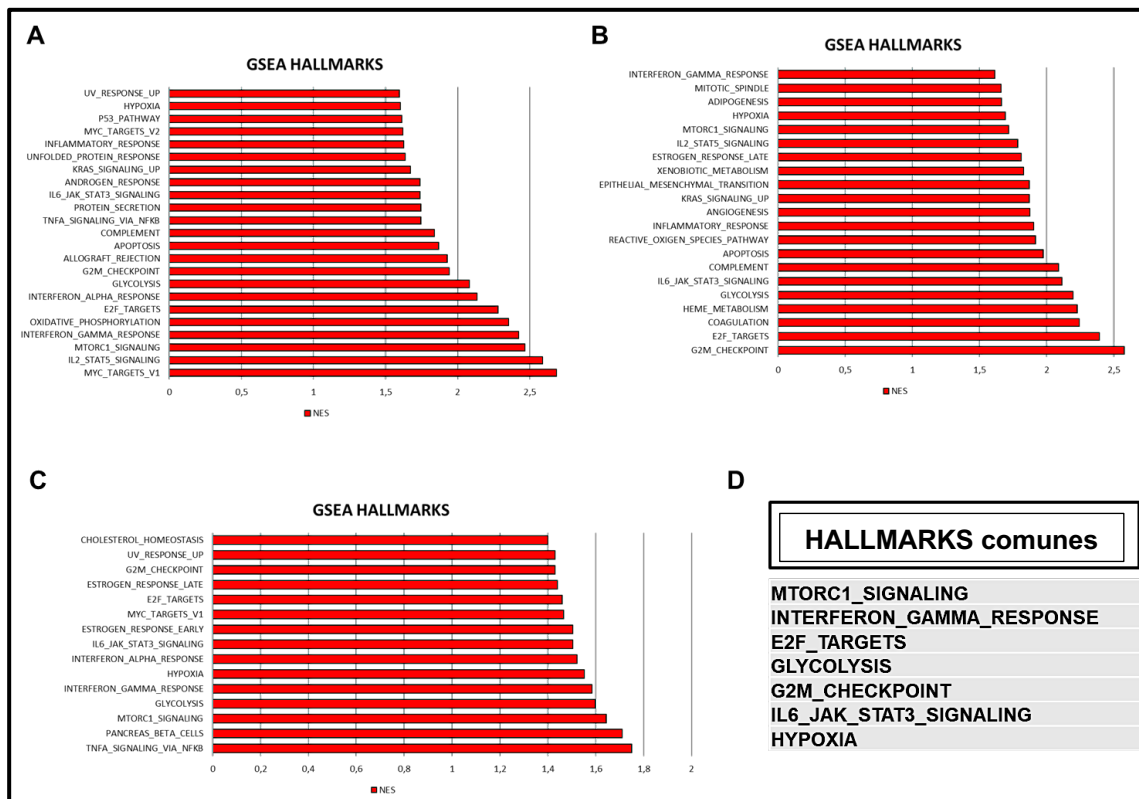


Figura 31. Análisis de enriquecimiento (GSEA) de las firmas transcripcionales (HALLMARKS) de bazo de ratón con expresión condicional de HGAL. GSEA de las firmas transcripcionales de bazo de ratón *Rosa26^{HGAL}/Sca1-Cre* (A); *Rosa26^{HGAL}/Mb1-Cre* (B); *Rosa26^{HGAL}/Aid-Cre*, (C) y comunes a los tres modelos animales (D), comparados con ratones control (*WT*) de la misma camada. Elaboración propia.

El análisis de la reexpresión de HGAL en células linfomatosas reveló una disminución en la expresión de la proteína BCL6 que fue aún más acusada tras la estimulación del BCR (**Figura 32**), lo que sugiere que la estimulación continua del BCR *in vivo* en tumores de tipo LCGBD puede dar lugar a una disminución de la expresión de la proteína BCL6.

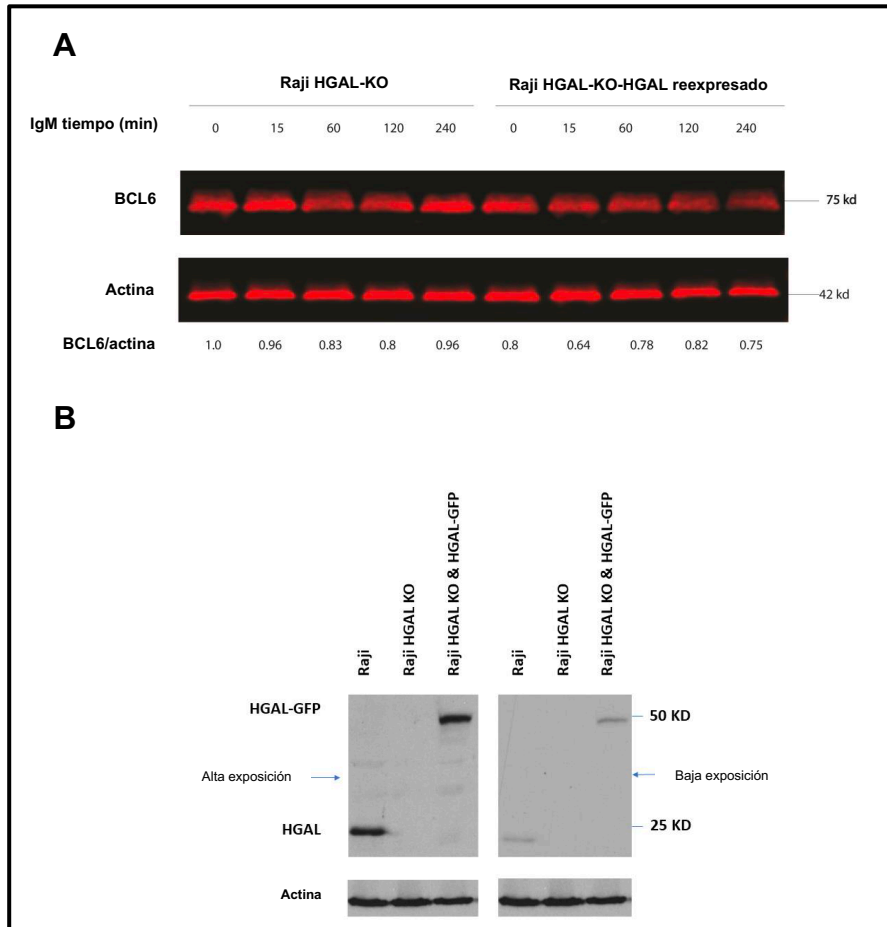


Figura 32. La expresión de HGAL reduce la expresión de la proteína BCL6 tras la estimulación del BCR. (A) Expresión de BCL6 tras 5 minutos de estimulación del BCR en células *Raji* con bloqueo de HGAL por CRISPR-Cas9 (RHKO) y células RHKO en las que existe reexpresión de HGAL. **(B)** Expresión de HGAL en las células mostradas en A. Elaboración propia.

3.3. Identificación del perfil mutacional del LCGBD murino

Para caracterizar aún más los tumores LCGBD con ganancia de función HGAL, realizamos la secuenciación del exoma de 8 muestras de tumores murinos, emparejadas con el ADN de la cola de la línea germinal como referencia (**Tabla 3**). Debido al estado de preservación de las muestras, su tratamiento y su disponibilidad, tan solo pudieron secuenciarse muestras de dos grupos de interés (*Rosa26^{HGAL}/Scal-Cre* y *Rosa26^{HGAL}/Mbl-Cre*) de forma desequilibrada por no disponer de más *stock*.

Tabla 3. Muestras tumorales caracterizadas por secuenciación de exoma completo (WES).

Muestra	Tejido	Patología	Genotipo	Código	Sexo
1	Bazo	Linfoma B	Rosa26 ^{HGAL} /Sca1-Cre	O629	Hembra
2	Bazo	Linfoma B	Rosa26 ^{HGAL} /Sca1-Cre	O502	Macho
3	Bazo	Linfoma B	Rosa26 ^{HGAL} /Sca1-Cre	J393	Macho
4	Bazo	Linfoma B	Rosa26 ^{HGAL} /Sca1-Cre	J664	Hembra
5	Bazo	Linfoma B	Rosa26 ^{HGAL} /Sca1-Cre	O505	Hembra
6	Bazo	Linfoma B	Rosa26 ^{HGAL} /Sca1-Cre	O501	Macho
7	Bazo	Linfoma B	Rosa26 ^{HGAL} /Mb1-Cre	O152	Hembra
8	Bazo	Linfoma B	Rosa26 ^{HGAL} /Mb1-Cre	0957	Hembra

Algunas mutaciones coincidieron con los puntos críticos de AID clásicos (WRCY o el RGYW inverso en 0-17% de mutaciones por tumor), mientras que otros probablemente fueron causados por diferentes mecanismos.

Algunos de los genes mutados, se habían descrito previamente en tumores humanos del tipo LCGBD, con 18 mutaciones detectadas previamente, de forma recurrente, en un 0.7% de los tumores humanos analizados LCGBD y que afectaban a los genes *PIMI*, *GNAI3*, *FAS*, *PDF4DIP*, *NFKBIA* y *PTPN6* (señalados en rojo en la **Tabla 4**). Hay que destacar que la distribución de estas mutaciones fue azarosa y no existió ningún grado de selección génica diferencial entre cepas de ratón.

Aunque algunas de las mutaciones en estos 6 genes ya se habían descrito anteriormente en tumores humanos LCGBD de tipo centro germinal y células B activadas, otras se detectaron exclusivamente en linfoma de células grande B difuso de centro germinal humano (*GNAI3* y *PTPN6*), que también apuntan al centro germinal como origen del linfoma de células grandes B difuso murino asociado con la expresión condicional de HGAL.

Estos hallazgos indican que los tumores se originaron a partir de linfocitos que experimentaron una reacción del centro germinal con actividad AID.

Tabla 4. Mutaciones somáticas adquiridas en tumores *Rosa26^{HGAL}/Sca1-Cre* y *Rosa26^{HGAL}/Mb1-Cre* (n=8).

Gen	Ratones con mutación	Mutaciones totales	Gen humano	Pacientes DLBCL con mutación en el gen de interés (total=138)	MutSigCV q	Shipp cluster	% GCB	% ABC	Freq murino	Freq humano
Pim1	1	3	PIM1	67	1,34552E-12	1	9,52	28,57	12,5	48,55
Ttn	1	1	TTN	54	1		42,50	12,50	12,5	39,13
Gna13	1	1	GNA13	33	6,4723E-08	1	38,46	0,00	12,5	23,91
Sis	1	1	SI	28	1		84,21	5,26	12,5	20,29
Fas	2	2	FAS	24	2,01827E-13	1	10,00	0,00	25	17,39
Pde4dip	1	1	PDE4DIP	24	0,03492152	1	28,57	0,00	12,5	17,39
Xirp2	1	1	XIRP2	24	1		62,96	22,22	12,5	17,39
Abnak2	1	1	AHNK2	21	1		36,36	9,09	12,5	15,22
Nfkbia	1	1	NFKBIA	15	5,21761E-11	1	20,00	20,00	12,5	10,87
Ptpn6	1	1	PTPN6	13	2,17012E-05	1	40,00	0,00	12,5	9,42
Cmya5	1	1	CMYA5	12	1		83,33	0,00	12,5	8,70
Grik2	1	1	GRIK2	12	1		72,73	9,09	12,5	8,70
Actg1	1	1	ACTG1	11	1		42,86	14,29	12,5	7,97
Chd4	1	2	CHD4	11	0,9911126		50,00	0,00	12,5	7,97
Flg2	1	1	FLG2	11	1		40,00	0,00	12,5	7,97
Lama2	1	1	LAMA2	11	1		76,47	5,88	12,5	7,97
Cdh11	1	1	CDH11	10	1		42,86	0,00	12,5	7,25
Ros1	1	1	ROS1	10	1		100,00	0,00	12,5	7,25
Adams20	1	1	ADAMTS20	9	1		100,00	0,00	12,5	6,52
Kdm3b	1	1	KDM3B	9	1		0,00	40,00	12,5	6,52
Pard3b	1	1	PARD3B	8	1		33,33	0,00	12,5	5,80
Sh3bp4	1	1	SH3BP4	8	1		25,00	0,00	12,5	5,80
Tfap2d	1	1	TFAP2D	8	1		0,00	0,00	12,5	5,80
Zfp521	1	1	ZNF521	8	1		37,50	37,50	12,5	5,80
Focad	1	1	FOCAD	7	1		66,67	33,33	12,5	5,07
Nek1	1	1	NEK1	7	1		0,00	0,00	12,5	5,07
Chsy3	1	1	CHSY3	6	1		25,00	50,00	12,5	4,35
Htt	1	1	HTT	6	1		80,00	0,00	12,5	4,35
Ppfia2	1	1	PPFIA2	6	1		25,00	25,00	12,5	4,35

El análisis por PCR de las cadenas pesadas de inmunoglobulina reordenadas confirmó que todos los tumores de células B eran clonales (**Figura 27D**) y albergaban mutaciones somáticas con predominio de transiciones (especialmente el intercambio de C a T), independientemente del impulsor del promotor encargado de la expresión de HGAL en ratones (**Figura 33**).

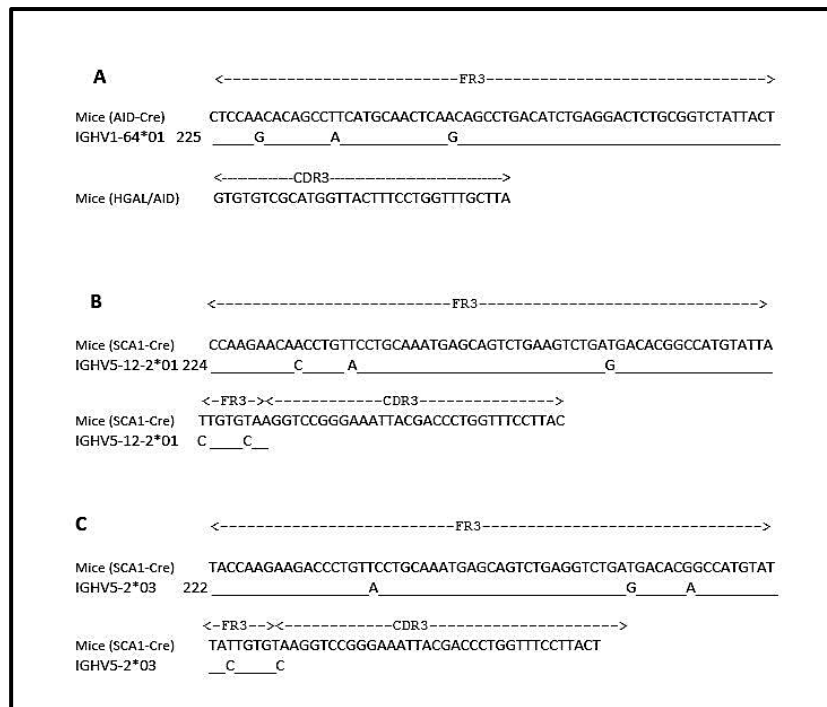


Figura 33. Secuenciación representativa de tres tumores murinos. Representación de la secuenciación de tumores originados en ratones *Rosa26^{HGAL}/Aid-Cre* (A) y *Rosa26^{HGAL}/Sca1-Cre* (B y C) que evidencia la presencia de mutaciones somáticas en los genes de inmunoglobulinas clonales. Elaboración propia.

En total, observamos 124 mutaciones sin-sentido o de sentido erróneo en 110 genes, con una media de 15 por tumor (**Figura 34**).

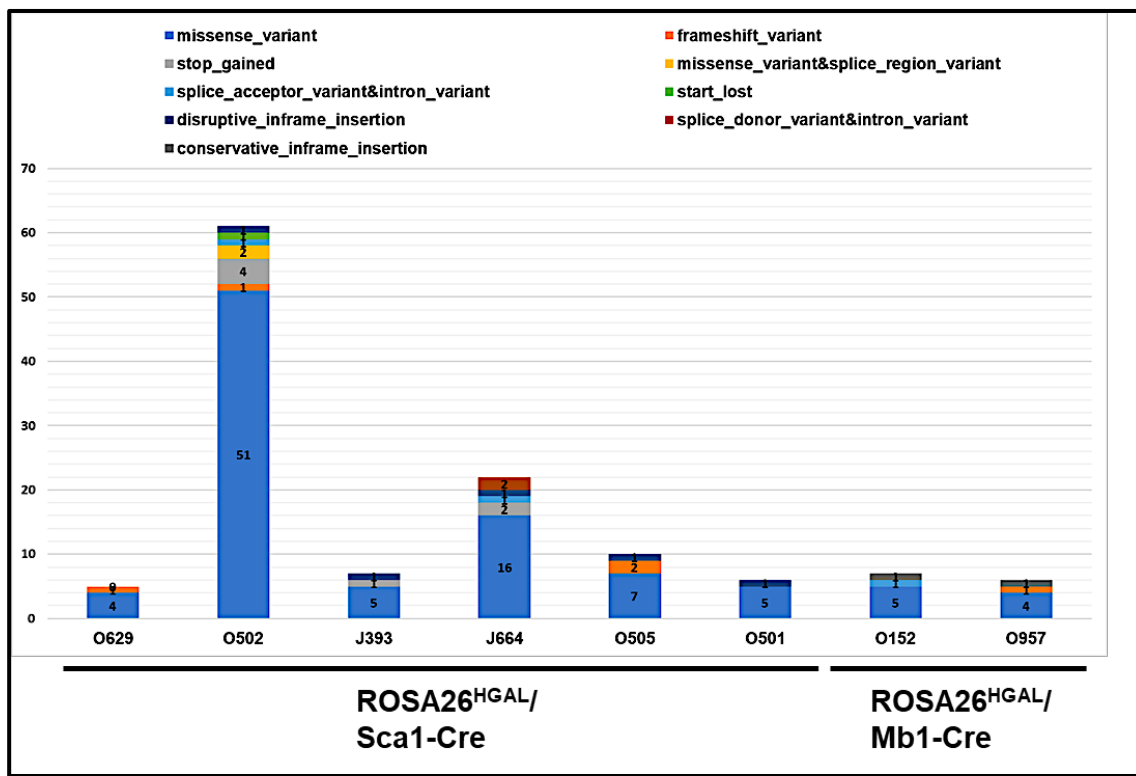


Figura 34. Representación gráfica de mutaciones somáticas adquiridas en modelos murinos con expresión condicional de HGAL. Número y clasificación de mutaciones somáticas adquiridas basados en la secuenciación del exoma de tumores murinos *Rosa26^{HGAL}/Sca1-Cre* y *Rosa26^{HGAL}/Mb1-Cre* (n=8). Elaboración propia.

Nuestros resultados evidenciaron el diseño de un modelo *in vivo* con una sobreexpresión condicional de HGAL en distintos compartimentos hematopoyéticos, según el promotor empleado (progenitores multipotentes, *Rosa 26^{HGAL}/Sca1-Cre*; células pro-B, *Rosa 26^{HGAL}/Mb1-Cre*; células B de centro germinal, *Rosa 26^{HGAL}/Aid-Cre*). Todos ellos viables, sanos y sin muertes intra-útero, pero con una marcada esplenomegalia. La ganancia de expresión circunscrita al centro germinal dio lugar a ratones con un mayor número de células B de centro germinal. Esta expresión forzada de HGAL condujo a una menor supervivencia y el desarrollo de linfomas B que mimetizaban los LCGBD humanos. El perfil de expresión génica reveló el enriquecimiento en genes comunes a los 3 modelos, como la señalización mTORC1, la respuesta de interferón, las dianas E2F o la señalización de interleucina-6 (IL-6) /JAK/STAT3. Además, el perfil mutacional de los tumores murinos mostró coincidencias con el perfil mutacional de tumores humanos LCGBD de tipo centro germinal.

Discusión

Discusión

Este trabajo de Tesis demuestra que la expresión condicional en ratones de HGAL, una proteína que mejora la señalización de BCR y limita la movilidad y migración de células B, conduce al desarrollo de un linfoma que morfológica, inmunofenotípica y genéticamente se asemeja al linfoma de células grandes B difuso de tipo GCB¹.

El desarrollo de modelos celulares y animales, actualmente, sigue constituyendo una herramienta de primer nivel que facilita y determina la comprensión de los procesos biológicos implicados en el desarrollo del cáncer. En el caso concreto de los linfomas, se dispone de modelos celulares que permiten analizar el desarrollo de estos tumores y que son una pieza esencial en el desarrollo de nuevas terapias dirigidas.

El principal problema es la elección de la alteración genética que desencadena el proceso cancerígeno, dirigida principalmente a las células B del centro germinal, ya diferenciadas. Sin embargo, estos modelos animales no son capaces de mimetizar con exactitud la enfermedad humana ni a nivel biológico ni a nivel genético, por lo que resulta imprescindible hallar y establecer un modelo que reúna las características necesarias para un estudio y análisis más profuso y exhaustivo del LCGBD^{44,76,131,134,135}.

Los LNH son un conjunto de enfermedades muy heterogéneas A nivel genético, mientras que algunos tipos de LNH son enfermedades producidas por la fusión de dos genes y dan lugar a procesos de evolución muy lenta, como es el caso de los LF, otros LNH, como el LCGBD, no siempre están determinados por una fusión de génica y originan neoplasias agresivas, que pueden tratarse con éxito^{9,15,55,222,223}. Por este motivo, el estudio de nuevas proteínas implicadas en el desarrollo de los LCGBD es un aspecto muy relevante en el estudio de estos linfomas. En la actualidad, se sabe que la disrupción homeostática de procesos biológicos asociados al compartimento celular B, como la señalización del BCR y la regulación de la migración de estas, favorecen la linfomagénesis^{44,84,86,115}.

La proteína HGAL es una proteína adaptadora específica de células B responsable de la señalización del BCR y la motilidad de las células B. En células B sanas, *HGAL* se expresa en las células B del centro germinal, para inmediatamente después verse reprimido en estadios de diferenciación superiores. La mayoría de los tumores LCGBD, principalmente los de tipo de células B de centro germinal (GCB), aunque también los de tipo activado (ABC) expresan HGAL ^{83,88,104,141,154}.

Tal y como se ha indicado con anterioridad, HGAL se expresa fundamentalmente en linfocitos del centro germinal ¹⁴². Sin embargo, estudios experimentales con modelos animales también han demostrado la expresión de HGAL en células progenitoras multipotentes, granulocitos, macrófagos, linfocitos y progenitores linfoides comunes; a través del análisis de la expresión de M-17, análogo murino de HGAL, en los diferentes compartimentos hematopoyéticos (**Figura 35**) ^{62,195}.

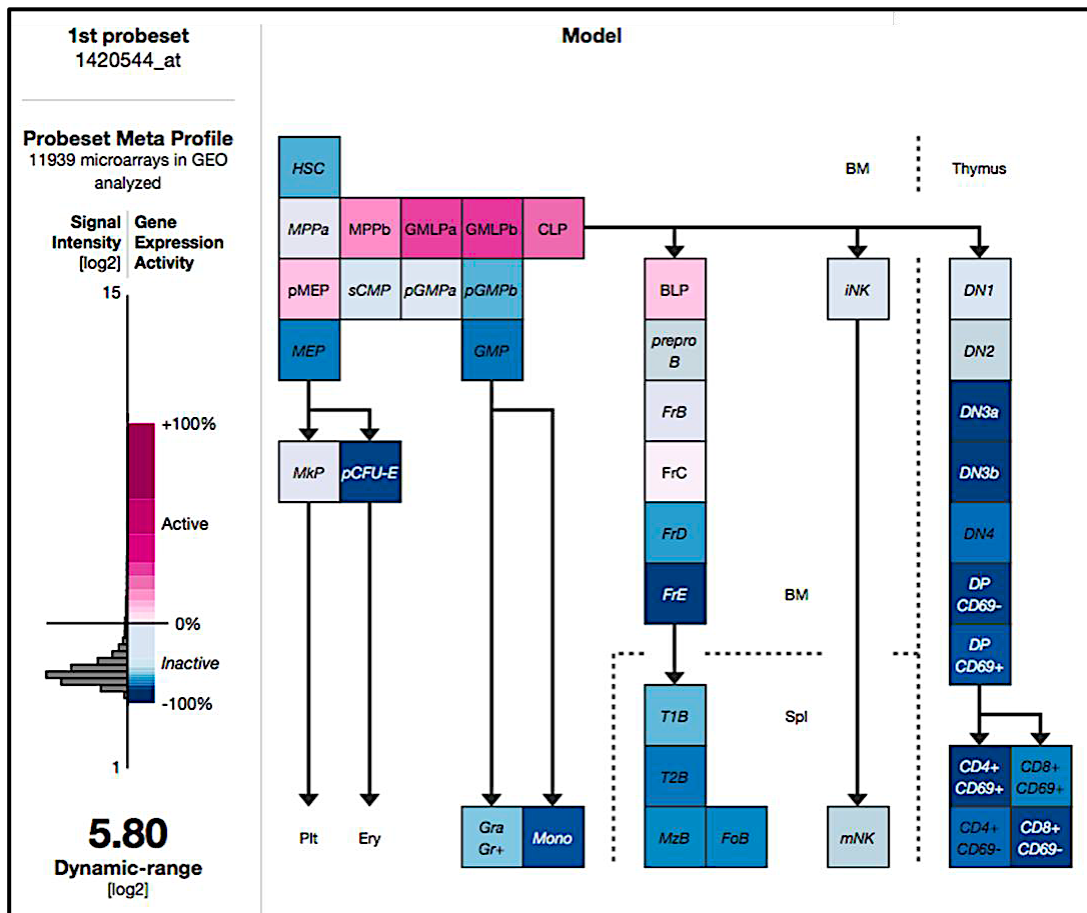


Figura 35. Expresión de M-17, análogo murino de HGAL, en los distintos compartimentos hematopoyéticos. El gen *M-17* se expresa en niveles significativamente más altos en progenitores linfoides normales (MPP, GMLO, CLP, BLP) que en las células progenitoras comprometidas. Analizamos la expresión relativa del gen *M-17* en 39 poblaciones de células hematopoyéticas de ratón utilizando la plataforma *Gene Expression Commons* en azul. HSC (población de células madre hematopoyéticas), MPPa (subpoblación A de progenitores multipotentes), MPPb (subpoblación B de progenitores multipotentes), GMLPa (subpoblación A de progenitores gránulo/macrófago/linfoides), GMLPb (subpoblación B de progenitores gránulo/macrófago/linfoides), CLP (progenitor linfoide común), pMEP (pre-megacariocito/progenitor de eritrocitos), sCMP (progenitor mielode común estricto), pGMPa (subpoblación A de progenitores de pregranulocitos/macrófagos), pGMPb (subpoblación B de progenitores de pregranulocitos/macrófagos), MEP (Progenitor de Megacariocitos/Eritrocitos), GMP (progenitor de granulocitos/macrófagos), MkP (progenitor de megacariocitos), pCFU-E (preCFU-E), Plt (plaquetas), Ery (Eritrocito), Gra (granulocito), Mono (Monocito), BLP (progenitor linfoide B temprano), prepro-B (células prepro-B), FrB (Fracción B de células B), FrC (Fracción C de células B), FrD (Fracción D de células B), FrE (Fracción E de células B); T1B (célula B T1); T2B (célula B T2); MzB (células B de la zona marginal); FoB (células B foliculares), iNK (célula asesina natural intermedia), mNK (célula asesina natural madura), DN (células T negativas dobles), DP (células T doblemente positivas). Elaboración propia.

Investigaciones previas han demostrado ampliamente que HGAL mejora la señalización del BCR y disminuye la capacidad de circulación y migración de los linfocitos, probablemente restringiendo los linfocitos del centro germinal al microambiente de este ^{1,91,150,166}. Esta proteína se caracteriza por una expresión restringida, principalmente al centro germinal y precursores tempranos en ratones (sin datos en humanos) ¹⁴², lo que plantea la posibilidad de que la expresión de HGAL en otras etapas del desarrollo hematopoyético pueda ser potencialmente perjudicial para las células B ^{146,150,153}.

A esto, se añade el hecho de que la estadificación definitiva de las lesiones genéticas no es evidente, puesto que los tumores pueden exhibir fenotipos asociados a una etapa concreta del desarrollo hematopoyético y presentar alteraciones genéticas asociadas a etapas de desarrollo anteriores. Por ello, se hace imprescindible el desarrollo de nuevos métodos basados en el análisis en profundidad de los mecanismos que desempeñan nuevas proteínas en el desarrollo de estos linfomas. Dentro de ellas, el estudio de HGAL es muy atractivo por su relación con BCR y por su implicación en el centro germinal^{146,150,165,166,171}. La investigación de *Schenten D et al.*, a través del diseño y análisis de un modelo *KO* para *M-17* (homólogo murino de *HGAL*) demostró ampliamente que la expresión de esta proteína resulta esencial para la completa funcionalidad del centro germinal⁶². Sin embargo y a pesar de todos estos hallazgos, aún no se ha logrado dilucidar con precisión y exactitud la importancia, a nivel biológico de la expresión de HGAL en el centro germinal^{144,146,150}.

En relación con la asociación de *HGAL* con el receptor celular B, esta ha sido descrita por varios autores^{150,165,166}. El BCR o receptor de células B está formado por cadenas ligeras y pesadas de las inmunoglobulinas ubicadas en la membrana plasmática, asociadas a los heterodímeros CD79a/CD79b¹⁷⁸, que poseen motivos ITAM en su arquitectura. La interacción antígeno-anticuerpo desencadena la activación del BCR. Después, CD79 dirige la transducción de señales hacia el interior de la célula, mediada por un proceso concatenado de fosforilaciones de residuos de tirosina por las quinasas LYN, FYN y BLK^{150,165,166,174,175}.

HGAL constituye una proteína citoplasmática con potencial función adaptadora, pues una vez estimulada da lugar a la fosforilación de sus propias tirosinas y recluta las proteínas localizadas en el citosol, transportándolas hacia la membrana plasmática, para formar un complejo de señalización^{146,157}. Asimismo, se sabe que HGAL es capaz de unirse al citoesqueleto, lo que la implica en el proceso de migración y motilidad celular^{143,148}. La IL-6 induce la fosforilación de HGAL, a través de la proteína LYN, imprescindible en la señalización del BCR^{137,141}. Esto posiciona a HGAL como una diana potencial por su papel biológico, fisiológico y funcional en el correcto desarrollo de las células B y la formación del centro germinal^{1,141,142,146,148,166}.

Para poner a prueba esta hipótesis de sobreexpresión condicional de HGAL en distintos estadios de desarrollo celular, se usó específicamente un alelo Cre que está activo en las células B del centro germinal (*Aid-Cre*)¹⁷³ y se agregaron alelos Cre que se expresan a partir de la célula pro-B (*Mbl-Cre*)⁵⁹ o de la HSC (*Sca1-Cre*)¹⁸⁷ como controles de nuestro estudio. Se puede observar a la luz de los resultados, que el desarrollo de linfoma B tuvo lugar independientemente del alelo Cre^{58,150}.

Estos datos parecen indicar que, con independencia de la etapa diferencial en la que HGAL se expresa condicionalmente, su sobreexpresión constitutiva conduce a un bloqueo en la diferenciación de las células B en la reacción del centro germinal, tal y como lo indica la presencia de genes de inmunoglobulina mutados en todos los tumores analizados, así como la expresión de PNA y la expresión enriquecida de otros genes asociados al centro germinal.

Además, en los tumores *Rosa26^{HGAL}/Sca1-Cre*, el GSEA reveló un enriquecimiento significativo de la expresión de genes que están altamente expresados en células B de centro germinal normales lo que indica su origen (GCB). De hecho, encontramos que los ratones *Rosa26^{HGAL}/Aid-Cre* poseían un mayor número de centros germinales de mayor tamaño y con una marcada expresión de HGAL en comparación con el resto de los grupos analizados, lo que sugiere que la expresión de HGAL supeditada al centro germinal influye en la formación y desarrollo de estos.

Estas observaciones están en sintonía con los datos recabados de pacientes que padecen un linfoma B de este tipo, en los que HGAL se expresa en el 90% de LCGBD de tipo GCB^{91,148,150}. También estos resultados concuerdan con nuestras observaciones previas en ratones transgénicos *Sca1-HGAL* que no llegaron a desarrollar linfoma B, en los que la expresión de HGAL está restringida al compartimento hematopoyético de HSC, que exhibieron una hipertrofia de las placas de Peyer intestinales, hiperplasia linfoide policlonal de células B y amiloidosis A reactiva sistémica^{92,150}. Además, todos los ratones con sobreexpresión de HGAL tenían un bazo sensiblemente de mayor tamaño que aquellos ratones con una expresión constitutiva de HGAL (WT), lo que se explicaría por la ganancia de función y su fuerte implicación en la activación del centro germinal^{146,154,156}.

Actualmente, se desconoce cómo HGAL puede contribuir al proceso maligno de linfomagénesis en humanos^{146,153}. Lo que sí se sabe es que la expresión de HGAL está estrictamente regulada y limitada al centro germinal^{11,122,171}, viéndose activada por la acción de la IL-4 y de la IL-13 secretadas por el microambiente del propio centro germinal^{144,148,185} y reprimida por la estimulación del BCR y CD40^{142,143,166}. Asimismo, la expresión de PRDM1¹⁵⁹ y mir-155^{211,224-226}, que están implicados en la finalización de la reacción del centro germinal y la diferenciación en células plasmáticas, también reprimen la expresión de HGAL.

Por todo ello, cualquier aberración genética que atrape o mantenga a las células B dentro de la etapa de centro germinal, tales como son las translocaciones/mutaciones de *BCL6* o las deleciones/mutaciones de *PRDM1* comúnmente observadas en los LCGBD humanos, permitirá la expresión constitutiva de HGAL^{93,121,211,227}. Sin embargo, la asociación de alteraciones en estas tres proteínas (BC6, PRDM1 y HGAL) no es constante en la mayoría de los LCGBD humanos.

De este modo, hay tumores humanos de tipo linfoma de células grande B difuso de centro germinal que expresan HGAL y CD10 (marcador de superficie común típico de centro germinal, junto a BCL6) sin expresión de BCL6. Por tanto, la coexpresión de HGAL y BCL6 no se observa en todos los tumores linfoma de células grande B difuso de centro germinal.

La ausencia de expresión de BCL6 en algunos tumores que expresan HGAL podría deberse a la estimulación mejorada del BCR con HGAL en estos tumores, tal y como se ha descrito en algunos estudios que muestran una disminución en la expresión de la proteína BCL6^{91,92,95}. Así, los LCGBD podrían producirse en un contexto en el que no estuviera implicado BCL6, algo que ocurre con relativa frecuencia en estos linfomas en humanos. De hecho, en nuestro trabajo, la reexpresión de HGAL en células linfomatosas condujo a una disminución en la expresión de la proteína BCL6 que fue aún más acusada tras la estimulación del BCR, lo que sugiere que la estimulación continua del BCR *in vivo* en tumores de tipo LCGBD puede dar lugar a una disminución de la expresión de la proteína.

Esta expresión constitutiva de HGAL podría desencadenar la reprogramación de las funciones biológicas normales y conducir a una señalización del BCR crónica e intensificada, así como a una restricción de las células B al centro germinal mediante la inhibición de sus capacidades de motilidad y migración, contribuyendo así a la patogenia del proceso de linfomagénesis¹. En este mismo sentido, estudios anteriormente realizados por el equipo de investigación mostraron una señalización mejorada del BCR y un incremento en la intensidad y densidad sináptica del BCR tras la estimulación del BCR en linfocitos *Rosa26^{HGAL}/Mbl-Cre* en comparación con los linfocitos de ratones control (*WT*) de la misma camada, que no expresan HGAL^{148,149}. Alternativamente, la expresión de HGAL podría desregularse durante la linfomagénesis por la adquisición de aberraciones genéticas que afectan a las regiones reguladoras, encargadas de controlar su expresión. Sin embargo, se desconoce si dichas alteraciones genéticas llegan a tener lugar¹⁶⁶.

Los linfomas observados en ratones ocurrieron en un marco temporal similar a partir de los 13 meses, independientemente del alelo Cre usado. Este hallazgo indica que son necesarios desencadenantes externos o aberraciones genéticas secundarias para el proceso de linfomagénesis, lo que refuerza el modelo de varios hitos en la producción y mantenimiento de este tipo de tumores. De hecho, tras el análisis de la identidad molecular de los linfomas difusos de células B grandes asociados a HGAL, se observaron mutaciones en múltiples genes (*PIMI*, *GNAI3*, *FAS*, *PDE4DIP*, *NFKBIA* y *PTPN6*); todos ellos implicados en la patogenia del LCGBD humano^{184,227}. En total, observamos 124 mutaciones sin-sentido o de sentido erróneo en 110 genes, con una media de 15 mutaciones por tumor; esto es similar a la media de 17 alteraciones genéticas por tumor encontradas en LCGBD humanos¹²¹. En esta línea de trabajo, las mutaciones asociadas al gen *GNAI3*, cuya expresión está aumentada en los linfocitos del centro germinal, son las de mayor interés para este estudio. Su principal función radica en la transmisión de señales S1PR2, que conduce al confinamiento restringido al centro germinal, similar a lo que sucede con la expresión constitutiva de HGAL²²⁸. Las mutaciones en *GNAI3* se encuentran entre las alteraciones genéticas más comunes en los linfomas de células B derivados de centro germinal, mientras que apenas se han hallado eventos genéticos en *GNAI3* asociados al resto de neoplasias malignas hematológicas, incluidos los linfomas que no están asociados a células B del centro germinal (GCB)^{121,125,213}.

Las investigaciones previas del equipo de trabajo y de otros grupos han demostrado que la delección de *GNA13* confiere una fuerte susceptibilidad al linfoma derivado de centro germinal en ratones que, similar a lo que ha ocurrido en nuestras muestras tumorales, expresaron IRF4²²⁸. Las mutaciones deletéreas en *GNA13* desregulan la señalización de AKT y dan lugar a la pérdida del confinamiento restringido al centro germinal, permitiendo que las células B salgan a circulación. La supervivencia de estas células fuera del centro germinal queda supeditada a la expresión de BCL2 o MYC^{61,95,100}. Por consiguiente, la expresión constitutiva concomitante de HGAL junto a las mutaciones en *GNA13* posibilitarían que las células B de centro germinal transformadas abandonen el confinamiento del centro germinal y se diseminen a la circulación y a otros órganos. Por este motivo, la interacción entre las vías de señalización de HGAL y S1PR2/GNA13 en los linfocitos del centro germinal y el linfoma deberían evaluarse en futuros estudios.

A ello, se suma el hecho de que el GSEA reveló una regulación diferencial positiva de *RGS1* (miembro de la familia oncogénica RAS) en las muestras tumorales, con respecto a esplenocitos sanos. Actualmente, se sabe que *RGS1* codifica un miembro del regulador de la familia de señalización de proteínas G que se expresa en células B, incluidos los linfocitos B de centro germinal. Este atenúa la actividad de señalización de las proteínas G mediante la unión a GTP unido a subunidades alfa del GTP activado, actuando como una proteína activadora de GTPasa. Hay que destacar que, al igual que *HGAL*, *RGS1* inhibe la migración de linfocitos inducida por quimioatrayentes y se ha demostrado que se expresa en linfomas humanos, incluidos los LCGBD.

En este mismo sentido, el análisis de enriquecimiento mostró una expresión diferencial positiva de *RAB10*, un gen con actividad GTPasa miembro de la familia RAS, que regula el tráfico de la membrana intracelular. Del mismo modo que sucede con *HGAL*, la expresión elevada de *RAB10* se ha asociado con una supervivencia más prolongada de los pacientes que padecen LCGBD.

Todos los datos previos sitúan a *HGAL* con un biomarcador de gran utilidad en los LCGBD²²⁹. De esta manera, nuestros resultados muestran claramente que todos los animales con una expresión condicional forzada de *HGAL* poseen significativamente una menor supervivencia global, con respecto a controles sanos (WT).

Además, la sobreexpresión de HGAL en progenitores hematopoyéticos no comprometidos, de carácter multipotente (*Scal-Cre*), merma notablemente la supervivencia específica de la enfermedad en comparación con otros estadios de desarrollo hematopoyético más diferenciados, como es el caso de células pro-B y células B del centro germinal (*Mbl-Cre* y *Aid-Cre*, respectivamente). Paradójicamente, nuestros resultados podrían parecer contradictorios con base en lo expuesto anteriormente y la literatura revisada. Sin embargo, esto podría responder a la actuación de HGAL a distintos niveles, es decir, mientras que en humanos su presencia, es sinónimo de una mayor supervivencia al detectarse en LCGBD-GCB (con buen pronóstico) en el momento del diagnóstico; en ratones, una actividad excesiva de su función favorece el desarrollo de LNH que, evidentemente, influyen en la supervivencia de estos al provocar su muerte a partir de los 13 meses (los LNH son de progresión lenta). Por tanto, la única manera de saber si nuestros modelos animales tienen mejor pronóstico que el resto de los ratones con LCGBD sería desarrollar un nuevo modelo con LCGBD de tipo ABC y comparar la supervivencia de estos con la descrita en nuestros resultados.

Hasta ahora, se creía que HGAL podría ser un biomarcador pronóstico de los LCGBD, pero todos los estudios hasta la fecha no han conseguido averiguar cuál es la relevancia biológica de la expresión de HGAL en linfocitos B del centro germinal y, más importante aún, si su alta expresión en linfomas derivados del centro germinal y en linfoma difuso de células B grandes tiene relación con la linfomagénesis. Por consiguiente, se desconoce con exactitud el papel biológico de *HGAL* en el centro germinal y si podría constituir un protooncogén, una potencial diana terapéutica o si desempeña un rol esencial en la patogenia del linfoma de células grandes B difuso por variaciones en su nivel de expresión, sobre todo, porque no existen modelos experimentales óptimos capaces de recrear con fidelidad la función de la proteína humana HGAL^{142,146,148}.

Sin embargo, a la luz de nuestros resultados se puede afirmar que *HGAL* es imprescindible en el correcto desarrollo del centro germinal por su implicación en las distintas etapas de desarrollo, formación y activación de este por su marcada función de proteína mediadora en la ampliación de la señalización del BCR y en la ontogenia del linaje B.

En resumen, el presente trabajo de Tesis Doctoral propone un nuevo modelo murino de linfomagénesis, capaz de reproducir y mimetizar fielmente el proceso tumorigénico y todas las características intrínsecas y derivadas del LCGBD.

La importancia de este modelo experimental reside en que es capaz de demostrar que la expresión constitutiva forzada de HGAL y, por ende, la ganancia de función de esta proteína desencadena la formación de un linfoma que fenocopia el linfoma de células grandes B difuso de tipo centro germinal humano.

La idoneidad de este modelo descansa en su capacidad para generar ratones con órganos linfoides normales y un desarrollo completamente normal de todos los compartimentos hematopoyéticos (linaje B, linaje T, linaje mieloide y linaje eritroide). Además, estos animales son viables y poseen un desarrollo normal de sus órganos hematopoyéticos.

En lo que respecta al desarrollo del proceso linfomatoso y sus consecuencias fenotípicas, estos son independientes del promotor empleado (*Scal-Cre*, *Mb1-Cre* o *Aid-Cre*) y del compartimento hematopoyético afectado (progenitores no comprometidos, HSC; progenitores de estirpe celular B, células pro-B y células B de centro germinal, GCB) lo que ubica a *HGAL* como un gen diana imprescindible en el desarrollo hematopoyético normal y en la patogénesis de la enfermedad.

Nuestro trabajo ha logrado establecer un modelo experimental ideal de los linfomas de células grandes B difusos, que pone de manifiesto el papel de *HGAL* a nivel biológico y su implicación en el desarrollo de la enfermedad a través de su expresión condicional forzada.

Así, nuestros resultados asocian directamente a HGAL a la linfomagénesis humana (**Figura 36**)¹.

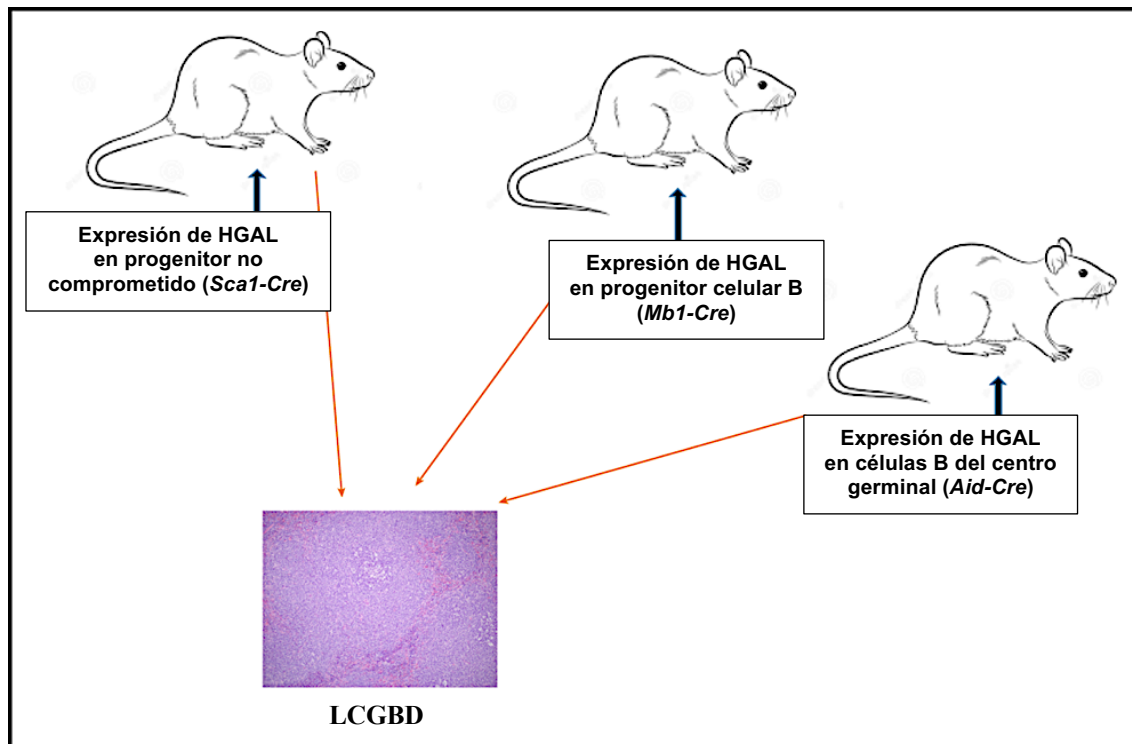


Figura 36. La expresión condicional de HGAL conduce al desarrollo de LCGBD en ratones. Diagrama resumen representativo de las tres cepas de ratón generadas: *Rosa26^{HGAL}/Sca1Cre*, *Rosa26^{HGAL}/Mb1-Cre* y *Rosa26^{HGAL}/Aid-Cre* y el desarrollo de LCGBD, por parte de estas. Se indica el compartimento hematopoyético involucrado (progenitor no comprometido; compartimento celular B y células B del centro germinal, de izquierda a derecha), según el promotor que regula la expresión condicional de HGAL (*Sca1-Cre*; *Mb1-Cre* y *Aid-Cre*, respectivamente). Los tres modelos, con independencia del promotor implicado, desarrollan LCGBD (tinción representativa de hematoxilina y eosina de una muestra de bazo murino que ha desarrollado linfoma B)¹. Elaboración propia.

En conjunto, la presente Tesis Doctoral supone un paso más hacia la búsqueda de nuevos tratamientos, que permitan definir con mayor exactitud el pronóstico de un grupo de enfermedades tan heterogéneas y características como son los linfomas de células grandes B difusos y una mayor comprensión de su origen y desarrollo. El diseño de un nuevo modelo de experimentación constituye una herramienta básica para el desarrollo de nuevas terapias e identificación de potenciales dianas terapéuticas. Así, este trabajo plantea la sobreexpresión de HGAL circunscrita a distintos estadios de desarrollo celular y diferenciación, a fin de comprender con mayor profundidad su función en el compartimento hematopoyético. Los resultados suponen un avance en el estudio las patologías linfomatosas, pues se genera un modelo murino *in vivo* de expresión condicional en el que se demuestra de forma clara y directa la implicación de HGAL en el desarrollo de LCGBD. Nuestros hallazgos arrojan luz sobre un conocimiento más exhaustivo sobre la biología de los LCGBD y su potencial abordaje desde la perspectiva de la medicina personalizada¹.

Conclusiones

Conclusiones

1. La expresión constitutiva reforzada de HGAL genera centros germinales de mayor número y tamaño, cuando su sobreexpresión condicional se limita al centro germinal. Esta expresión no produce alteraciones en la homeostasis hematopoyética, dando lugar a animales viables, tejidos y órganos hematopoyéticos normales; desarrollo y morfología de órganos linfoides normales y estado madurativo normal.
2. La expresión condicional de HGAL genera diferencias significativas en los niveles de expresión y enriquecimiento de genes asociados a distintas vías de señalización involucradas en la patogenia de la enfermedad (MTORC1, IFN-g, E2F, glicólisis, G2M, IL6-JAK/STAT3 e hipoxia), además de la aparición de perfiles mutacionales vinculados a los LCGBD humanos de tipo BCG (*PIMI*, *GNAI3*, *FAS*, *PDE4DIP*, *NFKBIA* y *PTPN6*), lo que abre la posibilidad de nuevas vías de estudio basadas en el desarrollo de terapias que abarquen las moléculas implicadas en estas vías de señalización afectadas.
3. La ganancia de función de HGAL conduce al desarrollo de linfomas de células B, acompañados de esplenomegalia, que repercuten en la supervivencia global de los modelos animales generados. Además, nuestro estudio limita el desarrollo de estos tumores al linaje celular B, en el cual se experimenta la reacción del centro germinal con actividad AID, lo que coincide con lo descrito en humanos y concuerda con el resto de los resultados obtenidos.
4. La expresión condicional de HGAL en ratón genera linfomas B que mimetizan los LCGBD humanos independientemente del promotor empleado (*Scal-Cre*, *Mbl-Cre* o *Aid-Cre*) y del compartimento hematopoyético afectado (progenitores no comprometidos, células pro-B o células B de centro germinal), lo que posiciona a *HGAL* como un gen esencial en el desarrollo hematopoyético normal y en la patogenia de la enfermedad.

5. El desarrollo de un nuevo modelo *in vivo* de LCGBD pone de manifiesto el papel de HGAL a nivel biológico y su implicación en el desarrollo de la enfermedad a través de su expresión condicional forzada. Ello supone el establecimiento de una nueva diana terapéutica y destaca la importancia del origen celular de la patología, definiendo las bases de nuevas líneas de investigación basadas en el desarrollo de modelos celulares y animales enfocados en el estudio de este gen.

Bibliografia

Bibliografía

1. Raboso-Gallego J, Casado-García A, Jiang X, Isidro-Hernández M, Hernández H, Gentles AJ, et al. Conditional expression of HGAL leads to the development of diffuse large B-cell lymphoma in mice. *Blood* 2021; Vol. 137, n° 13, p. 1741-1753.
2. Campo E, Swerdlow SH, Harris NL, Pileri S, Stein H, Jaffe ES. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: Evolving concepts and practical applications. *Blood* 2011; Vol. 117, p. 5019-5032.
3. Grimm KE, O'Malley DP. Aggressive B cell lymphomas in the 2017 revised WHO classification of tumors of hematopoietic and lymphoid tissues. *Annals of Diagnostic Pathology* 2019; Vol. 38, p. 6-10.
4. Matasar MJ, Zelenetz AD. Overview of Lymphoma Diagnosis and Management. *Radiologic Clinics of North America* 2008; Vol. 46, p. 175-198.
5. Mugnaini EN, Ghosh N. Lymphoma. *Primary Care - Clinics in Office Practice* 2016; Vol. 43, p. 661-675.
6. Ferry JA. Extranodal Lymphoma. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 2008; Vol. 132, n° 4, p. 565-578.
7. Godfrey J, Leukam MJ, Smith SM. An update in treating transformed lymphoma. *Clinical Haematology* 2018; Vol. 31, p. 251-261.
8. Jiang M, Bennani NN, Feldman AL. Lymphoma classification update: T-cell lymphomas, Hodgkin lymphomas, and histiocytic/dendritic cell neoplasms. *Expert Review of Hematology* 2017; Vol. 10, p. 239-249.
9. Jiang M, Bennani NN, Feldman AL. Lymphoma classification update: B-cell non-Hodgkin lymphomas. *Expert Review of Hematology* 2017; Vol. 10, p. 405-415.
10. Jaffe ES. Diagnosis and classification of lymphoma: Impact of technical advances. *Seminars in Hematology* 2019; Vol. 56, p. 30-36.
11. Azambuja D, Lossos IS, Biasoli I, Morais JC, Britto L, Scheliga A, et al. Human germinal center-associated lymphoma protein expression is associated with improved failure-free survival in Brazilian patients with classical Hodgkin lymphoma. *Leukemia & Lymphoma* 2009; Vol. 50, n° 11, p. 1830-1836.

12. Darbà J, Marsà A. Burden of Hodgkin and non-Hodgkin lymphoma in Spain over a 10-year period: productivity losses due to premature mortality. *Expert Review Pharmacoeconomics & Outcomes Research* 2021; Vol. 21, n° 1, p. 87-92.
13. Tun AM, Ansell SM. Immunotherapy in Hodgkin and non-Hodgkin lymphoma: Innate, adaptive and targeted immunological strategies. *Cancer Treatment Reviews* 2020; Vol. 88, p. 102042.
14. King H, Myatt R. An overview of non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer Nursing Practice* 2014; Vol. 13, n° 1, 31-38.
15. Ansell SM. Non-Hodgkin Lymphoma: Diagnosis and Treatment. *Mayo Clinic Proceedings* 2015; Vol. 90, n° 8, p. 1152-1163.
16. Cairo MS, Beishuizen A. Childhood, adolescent and young adult non-Hodgkin lymphoma: current perspectives. *British Journal of Haematology* 2019; Vol. 185, p. 1021-1142.
17. Chihara D, Nastoupil LJ, Williams JN, Lee P, Koff JL, Flowers CR. New insights into the epidemiology of non-Hodgkin lymphoma and implications for therapy. *Expert Review of Anticancer Therapy* 2015; Vol. 15, p. 531-544.
18. Piña-Oviedo S, Moran CA. Primary Mediastinal Nodal and Extranodal Non-Hodgkin Lymphomas. Current Concepts, Historical Evolution, and Useful Diagnostic Approach: Part 1. *Advances in Anatomic Pathology* 2019; Vol. 26, n° 6, p. 346-370.
19. Chiu BCH, Hou N. Epidemiology and etiology of non-hodgkin lymphoma. *Cancer Treatment Research* 2015; Vol. 165, p. 1-25.
20. Sander S, Calado DP, Srinivasan L, Köchert K, Zhang B, Rosolowski M, et al. Synergy between PI3K Signaling and MYC in Burkitt Lymphomagenesis. *Cancer Cell* 2012; Vol. 22, n° 2, p. 167-179.
21. Pasqualucci L, Bhagat G, Jankovic M, Compagno M, Smith P, Muramatsu M, et al. AID is required for germinal center-derived lymphomagenesis. *Nature Genetics* 2008; Vol. 40, n° 1, p. 108-112.
22. Knies N, Alankus B, Weilemann A, Tzankov A, Brunner K, Ruff T, et al. Lymphomagenic CARD11/BCL10/MALT1 signaling drives malignant B-cell proliferation via cooperative NF- κ B and JNK activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2015; Vol. 112, n° 52, p. 7230-7238.

23. Marinkovic D, Marinkovic T, Kokai E, Barth T, Möller P, Wirth T. Identification of novel Myc target genes with a potential role in lymphomagenesis. *Nucleic Acids Research* 2004; Vol. 32, n° 18, p. 5368-5378.
24. Riedell PA, Smith SM. Double hit and double expressors in lymphoma: Definition and treatment. *Cancer* 2018; Vol. 124, p. 4622-4632.
25. Laurent C, Charmpi K, Gravelle P, Tosolini M, Franchet C, Ysebaert L, et al. Several immune escape patterns in non-Hodgkin's lymphomas. *Oncoimmunology* 2015; Vol. 4, n° 8.
26. Chiu BCH, Hou N. Epidemiology and etiology of non-hodgkin lymphoma. *Cancer Treatment Research* 2015; Vol. 165, p. 1-25.
27. Al-Tourah AJ, Gill KK, Chhanabhai M, Hoskins PJ, Klasa RJ, Savage KJ, et al. Population-based analysis of incidence and outcome of transformed non-hodgkin's lymphoma. *Journal of Clinical Oncology* 2008; Vol. 26, n° 32, 5165-5169.
28. Lange J, Lenz G, Burkhardt B. Mature aggressive B-cell lymphoma across age groups—molecular advances and therapeutic implications. *Expert Review of Hematology* 2017; Vol. 10, p. 123-135.
29. Müller AMS, Ihorst G, Mertelsmann R, Engelhardt M. Epidemiology of non-Hodgkin's lymphoma (NHL): Trends, geographic distribution, and etiology. *Annals of Hematology* 2005; Vol. 84, p. 1-12.
30. Shankland KR, Armitage JO, Hancock BW. Non-Hodgkin lymphoma. *The Lancet* 2012; Vol. 380, p. 848-857.
31. Liberzon A, Birger C, Thorvaldsdóttir H, Ghandi M, Mesirov JP, Tamayo P. The Molecular Signatures Database Hallmark Gene Set Collection. *Cell Systems* 2015; Vol. 1, n° 6, p. 417-425.
32. Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. *Cell* 2000; Vol. 100, n° 1, p. 57-70.
33. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* 2011; Vol. 144, p. 646-674.
34. Greaves M. Evolutionary determinants of cancer. *Cancer Discovery* 2015; Vol. 5, p. 806-821.
35. Smith A, Howell D, Patmore R, Jack A, Roman E. Incidence of haematological malignancy by sub-type: A report from the Haematological Malignancy Research Network. *British Journal of Cancer* 2011; Vol. 105, n° 11, p. 1684-1692.

36. Anderson JR, Armitage JO, Weisenburger DD. Epidemiology of the non-Hodgkin's lymphomas: Distributions of the major subtypes differ by geographic locations. *Annals of Oncology* 1998; Vol. 9, n° 7, p. 717-720.
37. Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, Gascoyne RD, Delabie J, Ott G, et al. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood* 2004; Vol. 103, n° 1, p. 275-282.
38. Alaggio R, Amador C, Anagnostopoulos I, Attygalle AD, Araujo IB de O, Berti E, et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Lymphoid Neoplasms. *Leukemia* 2022; Vol. 36, p. 1720-1748.
39. Campo E, Swerdlow S, Dirnhofer pathology S, Ahmet Dogan S, Friedberg J, et al. The International Consensus Classification of Mature Lymphoid Neoplasms: a report from the Clinical Advisory Committee. *Blood* 2022; Vol. 140, n° 11, p. 1229-1253.
40. Tomassetti S, Samara Y, LaBarbera K, Qing X, Rathore R, Aleshin A, et al. Use of circulating tumor DNA in newly diagnosed DLBCL patients. *Journal of Clinical Oncology* 2022; Vol. 40, n° 16, p. 19552-19552.
41. Vaqué JP, Martínez N, Batlle-López A, Pérez C, Montes-Moreno S, Sánchez-Beato M, et al. B-cell lymphoma mutations: Improving diagnostics and enabling targeted therapies. *Haematologica* 2014; Vol. 99, p. 222-231.
42. Tibshirani R, Hastie T, Narasimhan B, Chu G. Diagnosis of multiple cancer types by shrunken centroids of gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2002; Vol. 99, n° 10, p. 6567-6572.
43. Verdant E, Dereure O, René C, Tempier A, Benammar-Hafidi A, Gallo M, et al. Diagnostic value of STMN1, LMO2, HGAL, AID expression and 1p36 chromosomal abnormalities in primary cutaneous B cell lymphomas. *Histopathology* 2017; Vol. 71, n° 4, p. 648-660.
44. Goldfinger M, Cooper DL. Refractory DLBCL: Challenges and Treatment. *Clinical Lymphoma, Myeloma & Leukemia* 2022; Vol. 22, n° 3, p. 140-148.
45. Shipp MA. Molecular Signatures Define New Rational Treatment Targets in Large B-Cell Lymphomas. *Hematology* 2007; n° 1, p. 265-269.

46. Rushton CK, Arthur SE, Alcaide M, Cheung M, Jiang A, Coyle KM, et al. Genetic and evolutionary patterns of treatment resistance in relapsed B-cell lymphoma. *Blood Advances* 2020; Vol. 4, n° 13, p. 2886-2898.
47. Eertink JJ, Arens AIJ, Huijbregts JE, Celik F, de Keizer B, Stroobants S, et al. Aberrant patterns of PET response during treatment for DLBCL patients with MYC gene rearrangements. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 2022; Vol. 49, n° 3, p. 943-952.
48. Vukcevic M, Yung M, Khan M, Schnell FM. Patient, caregiver, and physician preferences for treatment of relapsed or refractory diffuse large B-cell lymphoma (R/R DLBCL). *Journal of Clinical Oncology* 2022; Vol. 40, n° 16, p. 18710-18710.
49. Ertrand Oiffier BC, Ric Epage EL, Osette Rièrè JB, Aoul Erbrecht RH, Hervé Illy HT, Eda Ouabdallah RB, et al. CHOP chemotherapy plus Rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with Diffuse Large-B-Cell Lymphoma. *New England Journal of Medicine* 2002; Vol. 346, n° 4, p. 235-242.
50. Sun R, Medeiros LJ, Young KH. Diagnostic and predictive biomarkers for lymphoma diagnosis and treatment in the era of precision medicine. *Modern Pathology* 2016; Vol. 29, n° 10, p. 1118-1142.
51. Morin RD, Mendez-Lago M, Mungall AJ, Goya R, Mungall KL, Corbett RD, et al. Frequent mutation of histone-modifying genes in non-Hodgkin lymphoma. *Nature* 2011; Vol. 476, n° 7360, p. 298-303.
52. Savage KJ, Monti S, Kutok JL, Cattoretti G, Neuberg D, de Leval L, et al. The molecular signature of mediastinal large B-cell lymphoma differs from that of other diffuse large B-cell lymphomas and shares features with classical Hodgkin lymphoma. *Blood* 2003; Vol. 102, n° 12, p. 3871-3879.
53. Pasqualucci L, Bereschenko O, Niu H, Klein U, Basso K, Guglielmino R, et al. Molecular pathogenesis of non-Hodgkin's lymphoma: The role of Bcl-6. *Leukemia & Lymphoma* 2003; Vol. 44, n° 3, p. 5-12.
54. Rhee J, Birmann BM, de Roos AJ, Epstein MM, Martinez-Maza O, Breen EC, et al. Circulating immune markers and risks of non-Hodgkin lymphoma subtypes: A pooled analysis. *International Journal of Cancer* 2023; Vol. 152, n° 5, 865-878.
55. Ganapathi KA, Brown LE, Prakash S, Bhargava P. New developments in non-Hodgkin lymphoid malignancies. *Pathology* 2021; Vol. 53, p. 349-366.

56. Manji F, Puckrin R, Stewart DA. Novel synthetic drugs for the treatment of non-Hodgkin lymphoma. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 2021; Vol. 22, p. 1417-1427.
57. Ranger AM, Zha J, Harada H, Datta SR, Danial NN, Gilmore AP, et al. Bad-deficient mice develop diffuse large B cell lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2003; Vol. 100, n° 16, p. 9324-9329.
58. Mao X, Fujiwara Y, Orkin SH. Improved reporter strain for monitoring Cre recombinase-mediated DNA excisions in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1999; Vol. 96, n° 9, p. 5037-5042.
59. Hobeika E, Thiemann S, Storch B, Jumaa H, Nielsen PJ, Pelanda R, et al. Testing gene function early in the B cell lineage in mb1-cre mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2006; Vol 103, n° 37, p. 13789-13794.
60. Cattoretti G, Pasqualucci L, Ballon G, Tam W, Nandula S v., Shen Q, et al. Deregulated BCL6 expression recapitulates the pathogenesis of human diffuse large B cell lymphomas in mice. *Cancer Cell* 2005; Vol. 7, n° 5, p. 445-455.
61. Park SS, Kim JS, Tessarollo L, Owens JD, Peng L, Han SS, et al. Insertion of c-Myc into Igh Induces B-Cell and Plasma-Cell Neoplasms in Mice. *Cancer Research* 2005; Vol. 65, n° 4, p. 1306-1315.
62. Schenten D, Egert A, Pasparakis M, Rajewsky K. M17, a gene specific for germinal center (GC) B cells and a prognostic marker for GC B-cell lymphomas, is dispensable for the GC reaction in mice. *Blood* 2006; Vol. 107, n° 12, p. 4849-4856.
63. Knittel G, Liedgens P, Korovkina D, Seeger JM, Al-Baldawi Y, Al-Maarri M, et al. B-cell-specific conditional expression of Myd88 p.L252P leads to the development of diffuse large B-cell lymphoma in mice. *Blood* 2016; Vol. 127, n° 22, p. 2732-2741.
64. Martelli M, Ferreri AJM, Agostinelli C, di Rocco A, Pfreundschuh M, Pileri SA. Diffuse large B-cell lymphoma. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 2013; Vol. 87, p. 146-171.
65. de Leval L, Hasserjian RP. Diffuse Large B-Cell Lymphomas and Burkitt Lymphoma. *Hematology/Oncology Clinics of North America* 2009; Vol. 23, p. 791-827.
66. Murawski N, Zwick C, Pfreundschuh M. Unresolved issues in diffuse large B-cell lymphomas. *Expert Review of Anticancer Therapy* 2010; Vol. 10, p. 387-402.

67. Meriranta L, Pasanen A, Alkodsı A, Haukka J, Karjalainen-Lindsberg ML, Leppä S. Molecular background delineates outcome of double protein expressor diffuse large B-cell lymphoma. *Blood Advances* 2020; Vol. 4, n° 15, p. 3742-3753.
68. Davis RE, Ngo VN, Lenz G, Tolar P, Young RM, Romesser PB, et al. Chronic active B-cell-receptor signalling in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature* 2010; Vol. 463, n° 7277, p. 88-92.
69. Itami H, Nakamine H, Kubo M, Ogawa K, Tani R, Nakamura S, et al. Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) with significant intravascular invasion. Close resemblance of its clinicopathological features to intravascular large B-cell lymphoma, but not to DLBCL-not otherwise specified. *Journal of Clinical and Experimental Hematopathology* 2021; Vol. 61, n° 3, p. 152-161.
70. Alsaadi M, Khan MY, Dalhat MH, Bahashwan S, Khan MU, Albar A, et al. Dysregulation of mirnas in dlbcı: Causative factor for pathogenesis, diagnosis and prognosis. *Diagnostics* 2021; Vol. 11, n° 10, p. 1739.
71. Zhang J, Chen B. Analysis of Risk Factors Related to Relapse and Refractory DLBCL and Study of DLBCL Maintenance Therapy. *Blood* 2020; Vol. 136, n° 1, p. 32-33.
72. Susanibar-Adaniya S, Barta SK. Update on Diffuse large B cell lymphoma: A review of current data and potential applications on risk stratification and management. *American Journal of Hematology* 2021; Vol. 96, n° 5, p. 617-629.
73. Xie Y, Pittaluga S, Jaffe ES. The Histological Classification of Diffuse Large B-cell Lymphomas. *Seminars in Hematology* 2015; Vol. 52, p. 57-66.
74. Lenz G. Novel therapeutic targets in diffuse large B-cell lymphoma. *European Journal of Cancer*, 2013; Vol. 11, p. 262-263.
75. Jiang Y, Melnick A. The Epigenetic Basis of Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Seminars in Hematology* 2015; Vol. 52, p. 86-96.
76. Miyawaki K, Sugio T. Lymphoma Microenvironment in DLBCL and PTCL-NOS: the key to uncovering heterogeneity and the potential for stratification. *Journal of Clinical and Experimental Hematopathology* 2022; Vol. 62, n° 3, p. 127-135.
77. Xia M, David L, Teater MR, Gutierrez J, Wang X, Meydan C, et al. BCL10 mutations define distinct dependencies guiding precision therapy for DLBCL. *Blood Cancer Discovery* 2022; Vol. 3, p.28.

78. Wilson WH, Wright GW, Huang DW, Hodgkinson B, Balasubramanian S, Fan Y, et al. Effect of ibrutinib with R-CHOP chemotherapy in genetic subtypes of DLBCL. *Cancer Cell* 2021; Vol. 39, n° 12, p. 1643-1653.
79. Gordon MJ, Westin JR. Innovative Approaches in Untreated DLBCL. *Clinical Lymphoma, Myeloma & Leukemia* 2021; Vol. 21, p. 183-185.
80. Miao Y, Medeiros LJ, Li Y, Li J, Young KH. Genetic alterations and their clinical implications in DLBCL. *Nature Reviews Clinical Oncology* 2019; Vol. 16, p. 634-652.
81. Nissen M, Wang X, Sarkozy C, Jiang A, Ennishi D, Aoki T, et al. Immune Profiling of Diagnostic DLBCL Biopsies Dramatically Improves upon Cell-of-Origin Risk Stratification. *Blood* 2021; Vol. 138, n° 1, p. 719.
82. Nagao T, Yoshifuji K, Sadato D, Motomura Y, Saito M, Yamamoto K, et al. Establishment and characterization of a new activated B-cell-like DLBCL cell line, TMD12. *Experimental Hematology* 2022; Vol. 116, p. 37-49.
83. Hallas C, Preukschas M, Tiemann M. Immunohistochemical distinction of ABC and GCB in extranodal DLBCL is not reflected in mutation patterns. *Leukemia Research* 2019; Vol. 76, p. 107-111.
84. Carreras J, Kikuti YY, Beà S, Miyaoka M, Hiraiwa S, Ikoma H, et al. Clinicopathological characteristics and genomic profile of primary sinonasal tract diffuse large B cell lymphoma (DLBCL) reveals gain at 1q31 and RGS1 encoding protein; high RGS1 immunohistochemical expression associates with poor overall survival in DLBCL not otherwise specified (NOS). *Histopathology* 2017; Vol. 70, n° 4, p. 595-621.
85. Abdulhaq H, Albitar M. Using Targeted RNA Next Generation Sequencing and Differential Expression to Compare Primary Central Nervous System Lymphoma with CD+ DLBCL, Nodal DLBCL and EBV+ DLBCL. *Blood* 2020; Vol. 136, n° 1, p. 22.
86. Caner V, Cetin GO, Hacioglu S, Baris IC, Tepeli E, Turk N Sen, et al. The miRNA content of circulating exosomes in DLBCL patients and in vitro influence of DLBCL-derived exosomes on miRNA expression of healthy B-cells from peripheral blood. *Cancer Biomarkers* 2021; Vol. 32, p. 519-529.
87. Cerchietti LC, Ghetu AF, Zhu X, da Silva GF, Zhong S, Matthews M, et al. A Small-Molecule Inhibitor of BCL6 Kills DLBCL Cells *In Vitro* and *In Vivo*. *Cancer Cell* 2010; Vol. 17, n° 4, p. 400-411.

88. Serrano López J, Jiménez-Jiménez C, Chutipongtanate S, Serrano J, Rodríguez-Moreno M, Jiménez Á, et al. High-throughput RNA sequencing transcriptome analysis of ABC-DLBCL reveals several tumor evasion strategies. *Leukemia & Lymphoma* 2022; Vol. 63, nº 8, p. 1861-1870.
89. Bojarczuk K, Wienand K, Ryan JA, Chen L, Villalobos-Ortiz M, Mandato E, et al. Targeted inhibition of PI3Ka/d is synergistic with BCL-2 blockade in genetically defined subtypes of DLBCL. *Blood* 2019; Vol. 133, nº 1, p. 70-80.
90. Martín-Arruti M, Vaquero M, Díaz de Otazu R, Zabalza I, Ballesteros J, Roncador G, et al. Bcl-2 and BLIMP-1 expression predict worse prognosis in gastric diffuse large B cell lymphoma (DLCL) while other markers for nodal DLBCL are not useful. *Histopathology* 2012; Vol. 60, nº 5, p. 785-792.
91. Lossos C, Bayraktar S, Weinzierl E, Younes SF, Hosein PJ, Tibshirani RJ, et al. LMO2 and BCL6 are associated with improved survival in primary central nervous system lymphoma. *British Journal of Haematology* 2014; Vol. 165, nº 5, p. 640-648.
92. Green MR, Vicente-Dueñas C, Romero-Camarero I, Long Liu C, Dai B, González-Herrero I, et al. Transient expression of Bcl6 is sufficient for oncogenic function and induction of mature B-cell lymphoma. *Nature Communications* 2014; Vol. 5, nº 3904, p. 1-13.
93. Goteri G, Lucarini G, Zizzi A, Costagliola A, Giantomassi F, Stramazotti D, et al. Comparison of germinal center markers CD10, BCL6 and human germinal center-associated lymphoma (HGAL) in follicular lymphomas. *Diagnostic Pathology* 2011; Vol. 6, nº 1.
94. Ci W, Polo JM, Cerchietti L, Shaknovich R, Wang L, Shao NY, et al. The BCL6 transcriptional program features repression of multiple oncogenes in primary B cells and is deregulated in DLBCL. *Blood* 2009; Vol. 113, nº 22, p. 5536-5548.
95. Li W, Gupta SK, Han W, Kundson RA, Nelson S, Knutson D, et al. Targeting MYC activity in double-hit lymphoma with MYC and BCL2 and/or BCL6 rearrangements with epigenetic bromodomain inhibitors. *Journal of Hematology & Oncology* 2019; Vol. 12, nº 1.
96. Twa DDW, Mottok A, Savage KJ, Steidl C. The pathobiology of primary testicular diffuse large B-cell lymphoma: Implications for novel therapies. *Blood Reviews* 2018; Vol. 32, p. 249-255.

97. Shen H, Wei Z, Zhou D, Zhang Y, Han X, Wang W, et al. Primary extra-nodal diffuse Large B-Cell Lymphoma: A prognostic analysis of 141 patients. *Oncology Letters* 2018; Vol. 16, n° 2, p. 1602-1614.
98. Basso K, Dalla-Favera R. Roles of BCL6 in normal and transformed germinal center B cells. *Immunology Reviews* 2012; Vol. 247, n° 1, p. 172-183.
99. Parekh S, Prive G, Melnick A. Therapeutic targeting of the BCL6 oncogene for diffuse large B-cell lymphomas. *Leukemia & Lymphoma* 2008; Vol. 49, p. 874-882.
100. He M, Gao L, Zhang S, Tao L, Wang J, Yang J, et al. Prognostic significance of miR-34a and its target proteins of FOXP1, p53, and BCL2 in gastric MALT lymphoma and DLBCL. *Gastric Cancer* 2014; Vol. 17, n° 3, p. 431-441.
101. Thieblemont C, Bri EJ. MYC, BCL2, BCL6 in DLBCL: Impact for clinics in the future? *Blood* 2013; Vol. 121, n° 12, p. 2165-2166.
102. Campo E. MYC in DLBCL: Partners matter. *Blood* 2015; Vol. 126, p. 2439-2440.
103. Yoon SO, Jeon YK, Paik JH, Kim WY, Kim YA, Kim JE, et al. MYC translocation and an increased copy number predict poor prognosis in adult diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), especially in germinal centre-like B cell (GCB) type. *Histopathology* 2008; Vol. 53, n° 2, p. 205-217.
104. Gupta I, Lone MR, Ramteke P, Gogia A, Upadhyay A, Mallick S. ABCL-523 Immunohistochemical (IHC) Expression of Epigenetic Regulators (EZH-2 and H3K27) as well as Cell Cycle Regulators (P16, P53 and RB) in Patients Diagnosed With Primary Diffuse Large B-Cell Lymphoma (DLBCL) and Association With Therapy Response Rates and Survival. *Clinical Lymphoma, Myeloma & Leukemia* 2022; Vol. 22, n° 2, p. 382.
105. Fu H, Shen J, Zhou H, Zhang F, Li H, Ma Z, et al. Mutation profiling of circulating tumor DNA identifies distinct mutation patterns in non-Hodgkin lymphoma. *European Journal of Haematology* 2022; Vol. 108, n° 4, p. 298-309.
106. Nowakowski GS, Czuczman MS. ABC, GCB, and Double-Hit Diffuse Large B-Cell Lymphoma: Does Subtype Make a Difference in Therapy Selection? *American Society of Clinical Oncology Educational Book* 2015; p. 449-457.
107. de Groen AL, van Eijk R, Bohringer S, Wezel T van, Raghoo R, Ruano D, et al. Frequent mutated B2M, EZH2, IRF8, and TNFRSF14 in primary bone diffuse large B-cell lymphoma reflect a GCB phenotype. *Blood Advances* 2021; Vol. 5, n° 19, p. 3760-3775.

108. Scuto A, Kujawski M, Kowolik C, Krymskaya L, Wang L, Weiss LM, et al. STAT3 inhibition is a therapeutic strategy for ABC-like diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer Research* 2011; Vol. 71, n° 9, p. 3182-3188.
109. Greenbaum AM, Fromm JR, Gopal AK, Houghton AMG. Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) is infiltrated with activated CD8+T-cells despite immune checkpoint signaling. *Blood Research* 2022; Vol. 57, n° 2, p. 117-128.
110. Orellana Y, Velez-Mejia C, Ananth S, Liu Q, Michalek J, Diaz Duque AE. Discovering disparities in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL): A hispanic population comparison between Florida and Texas. *Journal of Clinical Oncology* 2022; Vol. 40, n° 16, p.18562-18562.
111. Nandennavar M, Nadella A, Vishnu Priyanka G. A Retrospective Study of Diffuse Large B Cell Lymphoma (DLBCL) from a Tertiary Cancer Hospital in South India. *Indian Journal of Cancer* 2018; Vol. 55, n° 1, p. 66-69.
112. Rutherford SC, Fachel AA, Li S, Sawh S, Muley A, Ishii J, et al. Extracellular vesicles in DLBCL provide abundant clues to aberrant transcriptional programming and genomic alterations. *Blood* 2018; Vol. 132, n° 7, p. 13-23.
113. Gene inactivation promotes immune escape in DLBCL. *Cancer Discovery* 2012; Vol. 2, n° 2, p. 8.
114. Xia M, David L, Teater M, Gutierrez J, Wang X, Meydan C, et al. BCL10 Mutations Define Distinct Dependencies Guiding Precision Therapy for DLBCL. *Cancer Discovery* 2022; Vol. 12, n° 8, p. 1922-1941.
115. Jiang W, Zhou S, Li J, Zhu G, Gao M, Zhao K, et al. B cell receptor (BCR) diversity and differential CDR3s usage as potential immune indicators of diffuse large B cell lymphoma (DLBCL). *Research Square* 2022; p. 1-23.
116. Agrawal T, Ansari SA, Bhamra S. Diagnostic surprise on IHC: A rare case of intramuscular DLBCL in thigh region mimicking sarcoma. *Archives of Cytology and Histopathology Research* 2022; Vol. 7, n° 3, p. 205-207.
117. Florindez JA, Lossos IS, Alderuccio JP. Localized DLBCL of the Tonsil: A U.S. Population-Based Survival Analysis. *Blood* 2021; Vol. 138, n° 1, p. 2522.
118. Tomas-Roca L, Rodriguez M, Alonso-Alonso R, Rodriguez-Pinilla SM, Piris MA. Diffuse Large B-Cell Lymphoma: Recognition of Markers for Targeted Therapy. *Hemato* 2021; Vol. 2, n° 2 p. 281-304.

119. Macdougall K, Day S, Nipp RD, Hall S, Zhao YD, Al-Juhaishi T, et al. Trends in the improvement in survival among patients with diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL). *47 Poster Session 2022*.
120. Schmitz R, Wright GW, Huang DW, Johnson CA, Phelan JD, Wang JQ, et al. Genetics and Pathogenesis of Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *New England Journal of Medicine* 2018; Vol. 378, n° 15, p. 1396-1407.
121. Chapuy B, Stewart C, Dunford AJ, Kim J, Kamburov A, Redd RA, et al. Molecular subtypes of diffuse large B cell lymphoma are associated with distinct pathogenic mechanisms and outcomes. *Nature Medicine* 2018; Vol. 24, n° 5, p. 679-690.
122. Holmes AB, Corinaldesi C, Shen Q, Kumar R, Compagno N, Wang Z, et al. Single-cell analysis of germinal-center B cells informs on lymphoma cell of origin and outcome. *Journal of Experimental Medicine* 2020; Vol. 217, n° 10.
123. Morin RD, Johnson NA, Severson TM, Mungall AJ, An J, Goya R, et al. Somatic mutations altering EZH2 (Tyr641) in follicular and diffuse large B-cell lymphomas of germinal-center origin. *Nature Genetics* 2010; Vol. 42, n° 2, p. 181-185.
124. Meyer PN, Fu K, Greiner TC, Smith LM, Delabie J, Gascoyne RD, et al. Immunohistochemical methods for predicting cell of origin and survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with Rituximab. *Journal of Clinical Oncology* 2011; Vol. 29, n° 2, p. 200-207.
125. Reddy A, Zhang J, Davis NS, Moffitt AB, Love CL, Waldrop A, et al. Genetic and Functional Drivers of Diffuse Large B Cell Lymphoma. *Cell* 2017; Vol. 171, n° 2, p. 481-494.
126. Lordick F. Towards risk-adapted perioperative treatment of gastroesophageal cancer. *Annals of Oncology* 2018; Vol. 29, p. 2282-2284.
127. Pasqualucci L, Dalla-Favera R. The Genetic Landscape of Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Seminars in Hematology* 2015; Vol. 52, p. 67-76.
128. Alizadeh AA, Gentles AJ, Alencar AJ, Liu CL, Kohrt HE, Houot R, et al. Prediction of survival in diffuse large B-cell lymphoma based on the expression of 2 genes reflecting tumor and microenvironment. *Blood* 2011; Vol. 118, n° 5, p.1350-1358.
129. Cheon DJ, Orsulic S. Mouse models of cancer. *Annual Review of Pathology* 2011; Vol. 6, p. 95-119.

130. Walrath JC, Hawes JJ, van Dyke T, Reilly KM. Genetically Engineered Mouse Models in Cancer Research. *Advances in Cancer Research* 2010; Vol. 106, p. 113-164.
131. Doyle A, McGarry MP, Lee NA, Lee JJ. The construction of transgenic and gene knockout/knockin mouse models of human disease. *Transgenic Research* 2012; Vol. 21, p. 327-349.
132. Frese KK, Tuveson DA. Maximizing mouse cancer models. *Nature Reviews Cancer* 2007; Vol. 7, p. 645-658.
133. Vecchio E, Fiume G, Correnti S, Romano S, Iaccino E, Mimmi S, et al. Insights about myc and apoptosis in b-lymphomagenesis: An update from murine models. *International Journal of Molecular Sciences* 2020; Vol. 21, p. 1-14.
134. Behringer R, Gertsenstein M, Vintersten K, Nagy A. Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual 2014; ed. 4, p. 1-814.
135. Cohen I, Salmon-Divon M, Peled S, Avivi I, Cohen YC, Luttwak E. Using Machine Learning Methods to Explore the Role of Non-Coding RNAs in DLBCL. *Blood* 2021; Vol. 138, n° 1, p. 4324.
136. Calado DP, Zhang B, Srinivasan L, Sasaki Y, Seagal J, Unitt C, et al. Constitutive Canonical NF- κ B Activation Cooperates with Disruption of BLIMP1 in the Pathogenesis of Activated B Cell-like Diffuse Large Cell Lymphoma. *Cancer Cell* 2010; Vol. 18, n° 6, p. 580-589.
137. Kovalchuk AL, Kim JS, Park SS, Coleman AE, Ward JM, Iii HCM, et al. IL-6 transgenic mouse model for extraosseous plasmacytoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2002; Vol 99, n° 3, p. 1509-1514.
138. Zhou P, Levy NB, Xie H, Qian L, Lee CYG, Gascoyne RD, et al. MCL1 transgenic mice exhibit a high incidence of B-cell lymphoma manifested as a spectrum of histologic subtypes. *Blood* 2001; Vol. 97, n° 12, p. 3902-3909.
139. Hoyer KK, French SW, Turner DE, N Nguyen MT, Renard M, Malone CS, et al. Dysregulated TCL1 promotes multiple classes of mature B cell lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2002; Vol. 99, n° 22, p. 14392-14397.
140. Steele-Perkins G, Fang W, Yang XH, van Gele M, Carling T, Gu J, et al. Tumor formation and inactivation of RIZ1, an Rb-binding member of a nuclear protein-methyltransferase superfamily. *Genes & Development* 2001; Vol. 15, n° 17, p. 2250-2262.

141. Lu X, Chen J, Malumbres R, Gil EC, Helfman DM, Lossos IS. HGAL, a lymphoma prognostic biomarker, interacts with the cytoskeleton and mediates the effects of IL-6 on cell migration. *Blood* 2007; Vol. 110, n° 13, p. 4268-4277.
142. Lu X, Sicard R, Jiang X, Stockus JN, Mcnamara G, Abdulreda M, et al. HGAL localization to cell membrane regulates B-cell receptor signaling. *Blood* 2015; Vol. 125, n° 4, p. 649-657.
143. Lu X, Kazmierczak K, Jiang X, Jones M, Watt J, Helfman DM, et al. Germinal center-specific protein human germinal center associated lymphoma directly interacts with both myosin and actin and increases the binding of myosin to actin. *FEBS Journal* 2011; Vol. 278, n° 11, p. 1922-1931.
144. Lossos IS, Alizadeh AA, Rajapaksa R, Tibshirani R, Levy R. HGAL is a novel interleukin-4-inducible gene that strongly predicts survival in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2003; Vol. 101, n° 2, p. 433-440.
145. Natkunam Y, Hsi ED, Aoun P, Zhao S, Elson P, Pohlman B, et al. Expression of the human germinal center-associated lymphoma (HGAL) protein identifies a subset of classic Hodgkin lymphoma of germinal center derivation and improved survival. *Blood* 2007; Vol. 109, n° 1, p. 298-305.
146. Menter T, Gasser A, Juskevicius D, Dirnhofner S, Tzankov A. Diagnostic Utility of the Germinal Center-associated Markers GCET1, HGAL, and LMO2 in Hematolymphoid Neoplasms. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology* 2014; Vol. 23, n° 7, p. 491-498.
147. Lossos IS, Morgensztern D. Prognostic Biomarkers in Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Journal of Clinical Oncology* 2006; Vol. 24, n° 6, p. 995-1007.
148. Jiang X, Lu XQ, Gentles AJ, Zhao D, Wander SA, Zhang Y, et al. HGAL inhibits lymphoma dissemination by interacting with multiple cytoskeletal proteins. *Blood Advances* 2021; Vol. 5, p. 5072-5085.
149. Jiang X, Lu X, Zhang Y, Lacaria L, Schuchardt BJ, Mikles DC, et al. Interplay between HGAL and Grb2 proteins regulates B-cell receptor signaling. *Blood Advances* 2019; Vol. 3, n° 15, p. 2286-2297.
150. Romero-Camarero I, Jiang X, Natkunam Y, Lu X, Vicente-Dueñas C, Gonzalez-Herrero I, et al. Germinal centre protein HGAL promotes lymphoid hyperplasia and amyloidosis via BCR-mediated Syk activation. *Nature Communications* 2013; Vol. 4, n° 1338, p. 1-12.

151. Younes SF, Beck AH, Lossos IS, Levy R, Warnke RA, Natkunam Y. Immunoarchitectural patterns in follicular lymphoma: Efficacy of HGAL and LMO2 in the detection of the interfollicular and diffuse components. *American Journal of Surgical Pathology* 2010; Vol. 34, n° 9, p. 1266-1276.
152. Gualco G, Bacchi LM, Domeny-Duarte P, Natkunam Y, Bacchi CE. The contribution of HGAL/GCET2 in immunohistological algorithms: A comparative study in 424 cases of nodal diffuse large B-cell lymphoma. *Modern Pathology* 2012; Vol. 25, n° 11, p. 1439-1445.
153. Karnik T, Ozawa MG, Lefterova M, Luna-Fineman S, Alvarez E, Link M, et al. The utility of IgM, CD21, HGAL and LMO2 in the diagnosis of pediatric follicular lymphoma. *Human Pathology* 2015; Vol. 46, n° 4, p. 629-633.
154. Temmins C, Zhao S, Lossos IS, Natkunam Y. HGAL Protein Expression Persists in Disorders of Germinal Center Dissolution Potential Role of HGAL in the Germinal Center Microenvironment. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology* 2011; Vol. 19, n° 3, p. 266-272.
155. Lossos IS, Czerwinski DK, Alizadeh AA, Wechser MA, Tibshirani R, Botstein D, et al. Prediction of Survival in Diffuse Large-B-Cell Lymphoma Based on the Expression of Six Genes. *New England Journal of Medicine* 2004; Vol. 350, n° 18, p. 1828-1837.
156. Jiang X, Lu X, Mcnamara G, Liu X, Cubedo E, Sarosiek KA, et al. HGAL, a germinal center specific protein, decreases lymphoma cell motility by modulation of the RhoA signaling pathway. *Blood* 2010; Vol. 116, n° 24, p. 5217-5227.
157. Pan Z, Shen Y, Ge B, Du C, McKeithan T, Chan WC. Studies of a germinal centre B-cell expressed gene, GCET2, suggest its role as a membrane associated adapter protein. *British Journal of Haematology* 2007; Vol. 137, n° 6, p. 578-590.
158. Cubedo E, Maurin M, Jiang X, Lossos IS, Wright KL. PRDM1/Blimp1 downregulates expression of germinal center genes LMO2 and HGAL. *FEBS Journal* 2011; Vol. 278, n° 17, p. 3065-3075.
159. Mandelbaum J, Bhagat G, Tang H, Mo T, Brahmachary M, Shen Q, et al. BLIMP1 Is a Tumor Suppressor Gene Frequently Disrupted in Activated B Cell-like Diffuse Large B Cell Lymphoma. *Cancer Cell* 2010; Vol. 18, n° 6, p. 568-579.
160. Dagan LN, Jiang X, Bhatt S, Cubedo E, Rajewsky K, Lossos IS. miR-155 regulates HGAL expression and increases lymphoma cell motility. *Blood* 2012; Vol. 119, n° 2, p. 513-520.

161. Wang JY. B Cells in Immunity and Tolerance. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 2020; ed. 1, p. 1-440.
162. Ghosn EEB, Yamamoto R, Hamanaka S, Yang Y, Herzenberg LA, Nakauchi H, et al. Distinct B-cell lineage commitment distinguishes adult bone marrow hematopoietic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2012; Vol. 109, n° 14, p. 5394-5398.
163. Küppers R, Klein U, Hansmann ML, Rajewsky K. Cellular Origin of Human B-Cell Lymphomas. *New England Journal of Medicine* 1999; Vol. 341, p. 1520-1529.
164. Matthias P, Rolink AG. Transcriptional networks in developing and mature B cells. *Nature Reviews Immunology* 2005; Vol. 5, p. 497-508.
165. Liu W, Tolar P, Song W, Kim TJ. Editorial: BCR Signaling and B Cell Activation. *Frontiers in Immunology* 2020; Vol. 11, n° 45, p. 1-20.
166. Guo F, Luo Y, Jiang X, Lu XQ, Roberti D, Lossos C, et al. Recent BCR stimulation induces a negative autoregulatory loop via FBXO10 mediated degradation of HGAL. *Leukemia* 2020; Vol. 34, n° 2, p. 553-566.
167. Efremov DG, Turkalj S, Laurenti L. Mechanisms of b cell receptor activation and responses to b cell receptor inhibitors in b cell malignancies. *Cancers* 2020; Vol. 12, n° 1396, p. 1-33.
168. Kelley CM, Ikeda T, Koipally J, Avitahl N, Wu L, Georgopoulos K, et al. Helios, a novel dimerization partner of Ikaros expressed in the earliest hematopoietic progenitors. *Current Biology* 1998; Vol. 8, n° 9, p. 508-515.
169. Sun J, Matthias G, Mihatsch MJ, Georgopoulos K, Matthias P. Lack of the Transcriptional Coactivator OBF-1 Prevents the Development of Systemic Lupus Erythematosus-Like Phenotypes in Aiolos Mutant Mice. *The Journal of Immunology* 2003; Vol. 170, n° 4, p.1699-1706.
170. Klein U, Dalla-Favera R. Germinal centres: Role in B-cell physiology and malignancy. *Nature Reviews Immunology* 2008; Vol. 8, p. 22-33.
171. Gars E, Butzmann A, Ohgami R, Balakrishna JP, O'Malley DP. The life and death of the germinal center. *Annals of Diagnostic Pathology* 2020; Vol. 44, n° 151421.
172. Ennishi D, Hsi ED, Steidl C, Scott DW. Toward a new molecular taxonomy of diffuse large b-cell lymphoma. *Cancer Discovery* 2020; Vol. 10, n° 9, p. 1267-1281.

173. Crouch EE, Li Z, Takizawa M, Fichtner-Feigl S, Gourzi P, Montañó C, et al. Regulation of AID expression in the immune response. *Journal of Experimental Medicine* 2007; Vol. 204, n° 5, p. 1145-1156.
174. Shinohara H, Yasuda T, Aiba Y, Sanjo H, Hamadate M, Watarai H, et al. PKC β regulates BCR-mediated IKK activation by facilitating the interaction between TAK1 and CARMA1. *Journal of Experimental Medicine* 2005; Vol. 202, n° 10, p. 1423-1431.
175. Maeda A, Scharenberg AM, Tsukada S, Bolen JB, Kinet JP, Kurosaki T. Paired immunoglobulin-like receptor B (PIR-B) inhibits BCR-induced activation of Syk and Btk by SHP-1. *Oncogene* 1999; Vol. 18, p. 2291-2297.
176. Allman D, Jain A, Dent A, Maile RR, Selvaggi T, Kehry MR, et al. BCL-6 Expression During B-Cell Activation. *Blood* 1996; Vol. 87, n° 12, p. 5257-5268.
177. Shaffer AL, Yu X, He Y, Boldrick J, Chan EP, Staudt LM. BCL-6 Represses Genes that Function in Lymphocyte Differentiation, Inflammation, and Cell Cycle Control finger (ZnF) DNA binding domain, in cells that normally. *Immunity* 2000; Vol. 13, n° 2, p. 199-212.
178. Clark MR, Campbell KS, Kazlauskas A, Johnson SA, Hertz M, Potter TA, et al. The B Cell Antigen Receptor Complex: Association of Ig-a and Ig-B with Distinct Cytoplasmic Effectors. *Science* 1992; Vol. 258, n° 5079, p. 123-126.
179. Saijo K, Schmedt C, Su I hsin, Karasuyama H, Lowell CA, Reth M, et al. Essential role of Src-family protein tyrosine kinases in NF- κ B activation during B cell development. *Nature Immunology* 2003; Vol. 4, n° 3, p. 274-279.
180. Oellerich T, Bremes V, Neumann K, Bohnenberger H, Dittmann K, Hsiao HH, et al. The B-cell antigen receptor signals through a preformed transducer module of SLP65 and CIN85. *EMBO Journal* 2011; Vol. 30, n° 17, p. 3620-3634.
181. Turner M, Billadeau DD. VAV proteins as signal integrators for multi-subunit immune-recognition receptors. *Nature Reviews Immunology* 2002; Vol. 2, p. 476-486.
182. Deane JA, Fruman DA. Phosphoinositide 3-kinase: Diverse roles in immune cell activation. *Annual Review of Immunology* 2004; Vol. 22, p. 563-598.
183. Hardy RR, Hayakawa K. B Cell Development Pathways. *Annual Review of Immunology* 2001; Vol. 19, p. 595-621.

184. Healy JA, Nugent A, Rempel RE, Moffitt AB, Davis NS, Jiang X, et al. GNA13 loss in germinal center B cells leads to impaired apoptosis and promotes lymphoma *in vivo*. *Blood* 2016; Vol. 127, n° 22, p. 2723-2731.
185. Natkunam Y, Lossos IS, Taidi B, Zhao S, Lu XQ, Ding F, et al. Expression of the human germinal center-associated lymphoma (HGAL) protein, a new marker of germinal center B-cell derivation. *Blood* 2005; Vol. 105, n° 10, p. 3979-3986.
186. George SHL, Gertsenstein M, Vintersten K, Korets-Smith E, Murphy J, Stevens ME, et al. Developmental and adult phenotyping directly from mutant embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2007; Vol. 104, n° 11, p. 4455-4460.
187. Mainardi S, Mijimolle N, Francoz S, Vicente-Dueñas C, Sánchez-García I, Barbacid M. Identification of cancer initiating cells in K-Ras driven lung adenocarcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2014; Vol. 111, n° 1, p. 255-260.
188. Casola S, Cattoretti G, Uyttersprot N, Koralov SB, Seagal J, Hao Z, et al. Tracking germinal center B cells expressing germ-line immunoglobulin 1 transcripts by conditional gene targeting. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2006; Vol. 103, n° 19, p. 7396-7401.
189. Choi WWL, Weisenburger DD, Greiner TC, Piris MA, Banham AH, Delabie J, et al. A new immunostain algorithm classifies diffuse large B-cell lymphoma into molecular subtypes with high accuracy. *Clinical Cancer Research* 2009; Vol. 15, n° 17, p. 5494-5502.
190. Tapia G, Lopez R, Muñoz-Mármol AM, Mate JL, Sanz C, Marginet R, et al. Immunohistochemical detection of MYC protein correlates with MYC gene status in aggressive B cell lymphomas. *Histopathology* 2011; Vol. 59, n° 4, p. 672-678.
191. Wagner SD, Neuberger MS. Somatic Hypermutation of Immunoglobulin Genes Vol. 16, *Annual Review of Immunology* 1996; Vol. 14, p. 441-457.
192. Yang Y, Wang C, Yang Q, Kantor AB, Chu H, Ghosn EE, et al. Distinct mechanisms define murine B cell lineage immunoglobulin heavy chain (IgH) repertoires. *eLife* 2015; Vol. 4, n° 9083, p. 1-31.
193. Oettinger MA. How to keep V(D)J recombination under control. *Immunological Reviews* 2004; Vol. 200, p. 165-181.

194. Li P, Chai J, Chen Z, Liu Y, Wei J, Liu Y, et al. Genomic Mutation Profile of Primary Gastrointestinal Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Frontiers in Oncology* 2021; Vol. 11, n° 622648, p. 1-11.
195. Seita J, Sahoo D, Rossi DJ, Bhattacharya D, Serwold T, Inlay MA, et al. Gene expression commons: An open platform for absolute gene expression profiling. *PLoS One* 2012; Vol. 7, n° 7, p. 1-11.
196. Monti S, Savage KJ, Kutok JL, Feuerhake F, Kurtin P, Mihm M, et al. Molecular profiling of diffuse large B-cell lymphoma identifies robust subtypes including one characterized by host inflammatory response. *Blood* 2005; Vol. 105, n° 5, p. 1851-1861.
197. Ndreas A, Osenwald R, Eorge G, Right W, Ing W, Han CC, et al. The use of Molecular Profiling to Predict Survival after Chemotherapy for Diffuse Large-B-Cell Lymphoma. *New England Journal of Medicine* 2002; Vol. 346, n° 25, p. 1937-1947.
198. Calvo KR, Traverse-Glehen A, Pittaluga S, Jaffe ES. Molecular Profiling Provides Evidence of Primary Mediastinal Large B-Cell Lymphoma as a Distinct Entity Related to Classic Hodgkin Lymphoma Implications for Mediastinal Gray Zone Lymphomas as an Intermediate Form of B-Cell Lymphoma. *Advances in Anatomic Pathology* 2004 ; Vol. 11, n° 5, p. 227-238.
199. Goss Tusher V, Tibshirani R, Chu G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2001; Vol. 98, n° 9, p. 5116-5121.
200. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the False Discovery Rate: a Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society* 1995; Vol. 57, n° 1, p. 289-300.
201. Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, Bolstad B, Dettling M, Dudoit S, et al. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biology* 2004; Vol. 5, n° 80, p. 1-16.
202. Green MR, Monti S, Dalla-Favera R, Pasqualucci L, Walsh NC, Schmidt-Suppran M, et al. Signatures of murine B-cell development implicate Yy1 as a regulator of the germinal center-specific program. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2011; Vol. 108, n° 7, p. 2873-2878.

203. Edgar R, Domrachev M, Lash AE. Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. *Nucleic Acids Research* 2002; Vol. 30, n° 1, p. 207-210.
204. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, et al. Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2005; Vol. 102, n° 43, p. 15545-15550.
205. Jiang L, Amir A, Morton JT, Heller R, Arias-Castro E, Knight R. Discrete False-Discovery Rate Improves Identification of Differentially Abundant Microbes. *mSystems* 2017; Vol. 2, n° 6.
206. Benjamini Y, Drai D, Elmer G, Kafkafi N, Golani I. Controlling the false discovery rate in behavior genetics research. *Behavioural Brain Research* 2001; Vol. 125, n° 1-2, p. 279-284.
207. Bolstad BM, Irizarry RA, Astrand M°, Speed TP. A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias *Bioinformatics* 2003; Vol. 19, n° 2, p. 185-193.
208. Rimmer A, Phan H, Mathieson I, Iqbal Z, Twigg SRF, Wilkie AOM, et al. Integrating mapping-, assembly- and haplotype-based approaches for calling variants in clinical sequencing applications. *Nature Genetics* 2014; Vol. 46, n° 8, p. 912-918.
209. Bartenhagen C, Dugas M. Robust and exact structural variation detection with paired-end and soft-clipped alignments: SoftSV compared with eight algorithms. *Briefing in Bioinformatics* 2016; Vol. 17, n° 1, p. 51-62.
210. Ng SB, Turner EH, Robertson PD, Flygare SD, Bigham AW, Lee C, et al. Targeted capture and massively parallel sequencing of 12 human exomes. *Nature* 2009; Vol. 461, n° 7261, p. 272-276.
211. Lohr JG, Stojanov P, Lawrence MS, Auclair D, Chapuy B, Sougnez C, et al. Discovery and prioritization of somatic mutations in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) by whole-exome sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2012; Vol. 109, n° 10, p. 879-884.
212. Blokzijl F, Janssen R, van Boxtel R, Cuppen E. MutationalPatterns: Comprehensive genome-wide analysis of mutational processes. *Genome Medicine* 2018; Vol. 10, n° 33, p. 1-11.

213. Dunham I, Kundaje A, Aldred SF, Collins PJ, Davis CA, Doyle F, et al. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature* 2012; Vol. 489, n° 7414, p. 57-74.
214. Pasqualucci L, Trifonov V, Fabbri G, Ma J, Rossi D, Chiarenza A, et al. Analysis of the coding genome of diffuse large B-cell lymphoma. *Nature Genetics* 2011; Vol. 43, n° 9, p. 830-837.
215. Morin RD, Mungall K, Pleasance E, Mungall AJ, Goya R, Huff RD, et al. Mutational and structural analysis of diffuse large B-cell lymphoma using whole-genome sequencing. *Blood* 2013; Vol. 122, n° 7, p. 1256-1265.
216. Liu S, Yang P, Wang J, Zhang W, Jing H. Next-Generation Sequencing Reveals Molecular Heterogeneity in Primary Testicular DLBCL. *Blood* 2021; Vol. 138, n° 1, p. 1426.
217. Forbes SA, Beare D, Gunasekaran P, Leung K, Bindal N, Boutselakis H, et al. COSMIC: Exploring the world's knowledge of somatic mutations in human cancer. *Nucleic Acids Research* 2015; Vol. 43, n° 1, p. 805-811.
218. Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, et al. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* 2009; Vol. 25, n° 16, p. 2078-2079.
219. Cibulskis K, Lawrence MS, Carter SL, Sivachenko A, Jaffe D, Sougnez C, et al. Sensitive detection of somatic point mutations in impure and heterogeneous cancer samples. *Nature Biotechnology* 2013; Vol. 31, n° 3, p. 213-219.
220. Li H. Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM. *arXiv* 2013; Vol. 0, n° 0, p. 1-3.
221. Li H, Durbin R. Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 2010; Vol. 26, n° 5, p. 589-595.
222. Solomon JP, Arcila ME. Molecular Diagnostics of Non-Hodgkin Lymphoma. *Cancer Journal* 2020; Vol. 26, n° 3, p. 186-194.
223. Merryman RW, Houot R, Armand P, Jacobson C. Immune and Cell Therapy in Non-Hodgkin Lymphoma. *Cancer Journal* 2020; Vol. 26, n° 3, p. 269-277.
224. Solé C, Larrea E, di Pinto G, Tellaexte M, Lawrie CH. miRNAs in B-cell lymphoma: Molecular mechanisms and biomarker potential. *Cancer Letters* 2017; Vol. 405, p. 79-89.

225. Hu M, Wang X, Liu N, Ding K, Zhang G, Liu X. Differential expression of miRNAs as biomarkers for predicting the outcomes of diffuse large B-cell lymphoma patients. *Bioscience Reports* 2021; Vol. 41, n° 7.
226. Leeksa OC, de Miranda NF, Veelken H. Germline mutations predisposing to diffuse large B-cell lymphoma. *Blood Cancer Journal* 2017; Vol. 7, n° 532, p. 1-9.
227. Pasqualucci L. The genetic basis of diffuse large B-cell lymphoma. *Current Opinion in Hematology* 2013; Vol. 20, n° 4, p. 336-344.
228. Muppidi JR, Schmitz R, Green JA, Xiao W, Larsen AB, Braun SE, et al. Loss of signalling via G α 13 in germinal centre B-cell-derived lymphoma. *Nature* 2014; Vol. 516, n° 7530, p. 254-258.
229. Gao YC, Sun B, Hu JL, Ren H, Zhou HH, Chen L, et al. Identification of gene modules associated with survival of diffuse large B-cell lymphoma treated with CHOP-based chemotherapy. *Pharmacogenomics Journal* 2020; Vol. 20, n° 5, p. 705-716.
230. Shingleton J, Wang J, Baloh C, Dave T, Davis N, Happ L, et al. Non-hodgkin lymphomas: Malignancies Arising from Mature B Cells. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2021; Vol. 11, n° 3, p. 1-20.

Anexos

1. Artículo de investigación derivado de la tesis doctoral



LYMPHOID NEOPLASIA

Conditional expression of HGAL leads to the development of diffuse large B-cell lymphoma in mice

Javier Raboso-Gallego,^{1,2,*} Ana Casado-García,^{1,2,*} Xiaoyu Jiang,³ Marta Isidro-Hernández,^{1,2} Andrew J. Gentles,^{4,5} Shuchun Zhao,⁶ Yaso Natkunam,⁶ Oscar Blanco,^{2,7} Verónica Domínguez,⁸ Belén Pintado,⁸ Diego Alonso-López,⁹ Javier De Las Rivas,^{2,10} Carolina Vicente-Dueñas,^{2,1} Izidore S. Lossos,^{3,11,†} and Isidro Sanchez-García^{1,2,†}

¹Experimental Therapeutics and Translational Oncology Program, Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer, Centro Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)/Universidad de Salamanca (USAL), Salamanca, Spain; ²Institute for Biomedical Research of Salamanca, Salamanca, Spain; ³Division of Hematology, Department of Medicine, University of Miami Miller School of Medicine, Sylvester Comprehensive Cancer Center, Miami, FL; ⁴Department of Medicine, ⁵Department of Biomedical Data Science, and ⁶Department of Pathology, Stanford University School of Medicine, Stanford, CA; ⁷Departamento de Anatomía Patológica, USAL, Salamanca, Spain; ⁸Transgenesis Facility Centro Nacional de Biotecnología–Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CNB-CBMSO), Consejo Superior de Investigaciones Científicas–Universidad Autónoma de Madrid (CSIC-UAM), Madrid, Spain; ⁹Bioinformatics Unit and ¹⁰Bioinformatics and Functional Genomics Research Group, Cancer Research Center, CSIC-USAL, Salamanca, Spain; and ¹¹Department of Molecular and Cellular Pharmacology, University of Miami Miller School of Medicine, Miami, FL

KEY POINTS

- Conditional expression of HGAL in mice leads to lymphoma that resembles human GC B-type DLBCL.
- Irrespective of the differential stage at which HGAL is expressed, it leads to a block in B-cell differentiation at the GC reaction.

Diffuse large B-cell lymphomas (DLBCLs) are clinically and genetically heterogeneous tumors. Deregulation of diverse biological processes specific to B cells, such as B-cell receptor (BCR) signaling and motility regulation, contribute to lymphomagenesis. Human germinal center associated lymphoma (HGAL) is a B-cell-specific adaptor protein controlling BCR signaling and B lymphocyte motility. In normal B cells, it is expressed in germinal center (GC) B lymphocytes and promptly downregulated upon further differentiation. The majority of DLBCL tumors, primarily GC B-cell types, but also activated types, express HGAL. To investigate the consequences of constitutive expression of HGAL in vivo, we generated mice that conditionally express human HGAL at different stages of hematopoietic development using 3 restricted Cre-mediated approaches to initiate expression of HGAL in hematopoietic stem cells, pro-B cells, or GC B cells. Following immune stimulation, we observed larger GCs in mice in which HGAL expression was initiated in GC B cells. All 3 mouse strains developed DLBCL at a frequency of 12% to 30% starting at age 13 months, leading to shorter survival. Immunohistochemical studies showed that all analyzed tumors

were of the GC B-cell type. Exon sequencing revealed mutations reported in human DLBCL. Our data demonstrate that constitutive enforced expression of HGAL leads to DLBCL development. (*Blood*. 2021;137(13):1741-1753)

Introduction

Diffuse large B-cell lymphomas (DLBCLs), the most common form of non-Hodgkin lymphoma, are phenotypically and genetically heterogeneous. Although DLBCLs are curable with a standard combination therapy regimen of rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone in 50% to 70% of patients, the remaining patients with primary refractory or relapsed disease usually succumb to this malignancy.¹ Elucidating the biology of DLBCLs is essential for developing better therapeutic approaches to improve DLBCL patient survival.

Marked advances in the understanding of DLBCL pathobiology have been made by the application of gene expression arrays, comparative genomic hybridization arrays, and next-generation sequencing.²⁻⁴ Gene expression profiling (GEP) studies led to the cell-of-origin classification identifying germinal center (GC) B-cell (GCB) type and activated B-cell (ABC) type DLBCL.² They

showed that DLBCLs can adapt regulatory biological features of normal B cells from which they originate in malignant states. Therefore, the biological functions of normal B-cell differentiation can be reprogrammed during transformation and propagation of DLBCLs.

High-throughput sequencing and copy number alteration studies identified an increasing number of driver genes deregulating diverse biological functions that lead or contribute to lymphomagenesis.^{7,8} Pathways affected by these genetic aberrations include those specific to B-cell lymphomas (eg, B-cell differentiation, B-cell receptor [BCR] signaling, and GCB motility regulation), as well as those contributing to the development of all types of cancers (eg, regulation of proliferation and apoptosis).^{9,10} Some of these genetic aberrations predominantly or exclusively occur in only 1 of the GEP-defined DLBCL subtype, whereas other genetic aberrations occur in >1 subtype. Aberrations involving

2. Estado microbiológico de los animales de experimentación

CONVENTIONAL FACILITY HEALTH MONITORING REPORT				SPF FACILITY HEALTH MONITORING REPORT
Timeline	When mice are moved to the conventional facility	1 year later	2 years later	
VIRUSES				
MAD (Adenovirus type 1 and 2)	NEG	NEG	NEG	NEG
MCMV (Mouse cytomegalovirus)	NEG	NEG	NEG	NEG
LCMV (Lymph choriomeningitis)	NEG	NEG	NEG	NEG
Ectromelia	NEG	NEG	NEG	NEG
EDIM	NEG	NEG	NEG	NEG
Hantaan virus	NEG	NEG	NEG	NEG
MHV (Mouse hepatitis virus)	POS	POS	POS	NEG
MVM (Minute virus)	NEG	NEG	NEG	NEG
MPV (Parvovirus type 1 and 2)	NEG	NEG	NEG	NEG
PVM (Pneumonia virus)	NEG	NEG	NEG	NEG
Reovirus type 3	NEG	NEG	NEG	NEG
Sendai	NEG	NEG	NEG	NEG
TMEV (Theiler's murine encephalomyelitis virus)	NEG	NEG	NEG	NEG
K virus	NEG	NEG	NEG	NEG
Polyoma virus	NEG	NEG	NEG	NEG
MNV (Norovirus)	POS	POS	POS	NEG
BACTERIA				
Bordetella bronchiseptica	NEG	NEG	NEG	NEG
Car-bacillus	NEG	NEG	NEG	NEG
Citrobacter rodentium	NEG	NEG	NEG	NEG
Clostridium piliforme (Tyzzer' disease)	NEG	NEG	NEG	NEG
Corynebacterium kutscheri	NEG	NEG	NEG	NEG
Mycoplasma pulmonis	NEG	NEG	NEG	NEG
Pasteurella pneumotropica	NEG	NEG	NEG	NEG
Pasteurella multocida	NEG	NEG	NEG	NEG
Salmonella spp	NEG	NEG	NEG	NEG
Streptobacillus moniliformis	NEG	NEG	NEG	NEG
Streptococci beta hemolíticos (A,G)	NEG	NEG	NEG	NEG
Streptococcus pneumoniae	NEG	NEG	NEG	NEG
Helicobacter spp	POS	POS	POS	NEG
PARASITES				
Ectoparasites	NEG	NEG	NEG	NEG
Helminth (A.tetraptrera, Syphacia spp)	NEG	NEG	NEG	NEG
Cestods (Hymenolepis spp)	NEG	NEG	NEG	NEG
Eimeria spp	NEG	NEG	NEG	NEG
Entamoeba muris	NEG	NEG	NEG	NEG
Giardia spp	NEG	NEG	NEG	NEG
Trichomonas muris	POS	POS	NEG	NEG
Spironucleus spp	NEG	NEG	NEG	NEG
Encephalitozoon cuniculi	NEG	NEG	NEG	NEG
NECROPSY	No gross lesion.	No gross lesion.	No gross lesion.	No gross lesion.
NEG: Negative				

