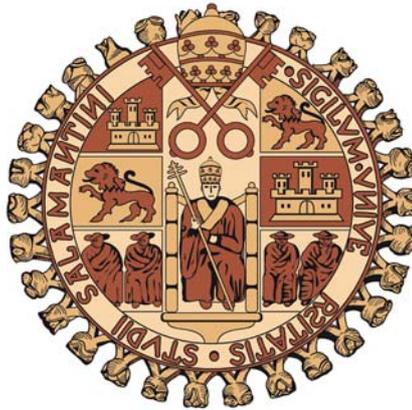


UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA

HEMATOLOGÍA



UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

TESIS DOCTORAL

**CONTRIBUCIÓN DE LOS MICROARRAYS
GENÓMICOS AL DIAGNÓSTICO Y
PRONÓSTICO DE LOS LINFOMAS NO
HODGKIN DE LÍNEA B.**

CRISTINA ROBLEDO MONTERO

2010

Este trabajo ha sido parcialmente financiado con las ayudas:

“Fundación Marcelino Botín” y “Fondo social Caja Burgos”

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

LNH: Linfoma No-Hodgkin

LH: Linfoma de Hodgkin

LNH-B: Linfoma No-Hodgkin de línea B

LNH-T: Linfoma No-Hodgkin de línea T

NK: “natural killer”

LF: linfoma folicular

ILSG: “International Lymphoma Study Group”

REAL: Revisión Europea Americana de Linfomas

OMS: Organización Mundial de la Salud

LDCGB: linfoma difuso de células grande B

LEZM: linfoma esplénico de la zona marginal

LB: linfoma de Burkitt

LLC: leucemia linfática crónica

LCM linfoma de las células del manto

LPMCB: Linfomas primarios del mediastino de células B

IGH: cadena pesada de las inmunoglobulinas

IGK, IGL: cadena ligera de las inmunoglobulinas

HGC: hibridación genómica comparada

HISF: hibridación “in-situ” fluorescente

CGH-array o Array genómico o Array CGH: Arrays basados en la HGC

YAC: cromosoma artificial de levadura

BAC: cromosoma artificial de bacteria

PAC: cromosomas artificiales de P-1

LDCGB-ABC: linfoma difuso de células grandes de células B activadas

LDCGB-CG: linfoma difuso de células grandes del centro germinal B

LOH: pérdida de heterocigosidad

PEG: perfil de expresión génica

IPI: índice de pronóstico internacional

ECOG: “Eastern Cooperative Oncologic Group”

LDH: lactato deshidrogenasa

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

SP: sangre periférica

MO: médula ósea

RC: remisión completa

SG: supervivencia global

TPH: Trasplante de progenitores hematopoyéticos

GEL/TAMO: Grupo Español de Linfomas/Trasplante Autólogo de Médula Ósea

CHOP: Quimioterapia con ciclofosfamida, adriamicina, vincristina y prednisona

IFE: Quimioterapia con ifosfamida y etopósido

MegaCHOP: Quimioterapia tipo CHOP, intensificando las dosis de ciclofosfamida y adriamicina

TAC: Tomografía axial computerizada

RCi: remisión completa incierta

RP: respuesta parcial

FT: fallo al tratamiento

β-2m: β-2microglobulina

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. LINFOMAS NO HODGKINIANOS	3
1.1. Concepto, historia y clasificación	3
1.2. Epidemiología de los LNH-B	4
1.3. Alteraciones genéticas de los LNH-B	5
1.3.1. Las traslocaciones en los LNH	5
1.3.2. Alteraciones genéticas secundarias	7
1.4. Repercusión clínica de las alteraciones cromosómicas en los LNH-B	9
2. ANÁLISIS GENÉTICO POR MICROARRAYS	10
2.1. Array Genómico	10
2.1.1. Concepto	10
2.1.2. Ventajas	11
2.1.3. Desventajas de los arrays genómicos	12
2.2. Arrays genómicos en los LNH-B	13
3. LINFOMA ESPLÉNICO DE LA ZONA MARGINAL	16
3.1. Características clínicas	16
3.2. Diagnóstico de los LEZM	17
3.2.1. Morfología de los LEZM	17
3.2.2. Inmunofenotipo	19
3.2.2. Alteraciones genéticas	19
4. LINFOMA DIFUSO DE CÉLULA GRANDE B	23
4.1. Perfil de expresión génica: Arrays de expresión	23
4.2. Inmunohistoquímica en los LDCGB	24
4.3. Alteraciones genómicas	26

4.3.1. Alteraciones primarias	26
4.3.2. Alteraciones secundarias	27
4.4. Factores pronósticos en los LDCGB	29
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	31
MATERIAL Y MÉTODOS	37
I. MATERIAL	39
II. MÉTODOS	39
1. BAC-Array	39
1.1. Diseño del BAC-array	40
1.2. Réplica de la librería	42
1.3. Cultivo de <i>Escherichia coli</i>	43
1.4. Extracción del ADN del clon	44
1.5. Amplificación del ADN por DOP-PCR	47
1.6. Precipitación de los productos de DOP-PCR	49
1.7. Depósito de los ADN de los BACs sobre un soporte sólido de vidrio con recubrimiento de amino-silano “Ultragaps Coated Slides”	50
1.8. Preparación del ADN para la hibridación (sonda)	51
1.9. Hibridación de las sondas sobre el BAC-array	60
1.9.3. Hibridación	62
1.9.4. Lavados post-hibridación	62
1.9.5. Adquisición de las imágenes	64
2. ARRAYS DE OLIGONUCLEOTIDOS: NimbleGen	64
3. HIBRIDACIÓN IN SITU FLUORESCENTE	67
3.1. HISF: Marcaje Directo	68
3.2. HISF sobre portaobjetos embebidos en parafina	71

RESULTADOS Y DISCUSIÓN	75
CAPÍTULO I: Estandarización de la técnica de Arrays Genómicos	77
1. Obtención de la librería	77
2. Réplica de la librería: Almacenaje en glicerol de los clones	78
3. Extracción del ADN del clon inserto en <i>E. coli</i>	78
4. Amplificación de los ADN extraídos de los cultivos de <i>E. coli</i>	79
5. Depósito de las sondas sobre el soporte sólido	80
5.1. Errores producidos durante el depósito de los clones en el BAC-array	81
5.2. Depósito de las sondas por triplicado	84
6. Nivel de resolución de los arrays genómicos	84
7. Hibridación	85
8. Análisis	87
8.1. Adquisición de la imagen	87
8.2. Análisis de la imagen	88
9. Normalización	90
9.1. Normalización global o manual	92
9.2. Normalización “Print-tip lowess” o GEPAS	93
9.3. Normalización por segmentación binaria (CBS)	96
10. Selección del método de análisis	97
11. Verificación del array y de la selección de las sondas	101
12. Análisis estadístico	109
CAPÍTULO II: Significado biológico y pronóstico de los cambios genómicos analizados mediante arrays genómicos en los Linfomas Esplénicos de la Zona Marginal	111
1. INTRODUCCIÓN	111

2. MATERIAL Y MÉTODOS	111
2.1. Descripción de los pacientes	111
2.2. Métodos	112
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	112
3.1. Descripción de los cambios genómicos detectados por BAC-arrays	112
3.2. Relación entre los cambios cromosómicos detectados mediante arrays genómicos y la progresión de los LEZM	117
3.3. Análisis de las pérdidas de 7q en los LEZM	120
3.3.1. Estudio por HISF	120
3.3.2. Análisis de alta resolución de las pérdidas en 7q en los LEZM	121
3.3.3. Cambios genómicos observados en los casos con pérdidas en 7q y en los casos sin alteraciones en 7q	127
 CAPÍTULO III: Significado biológico de los cambios genómicos analizados mediante arrays genómicos en los Linfomas Difusos de Célula Grande B	
1. INTRODUCCIÓN	131
2. MATERIAL Y MÉTODOS	131
2.1. Descripción de los pacientes	131
2.2. Métodos	133
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	134
3.1. Descripción de los cambios genómicos detectados por CGH-array	134
3.1.1. Validación mediante HISF de las alteraciones detectadas por arrays genómicos	138
3.2. Correlación entre los cambios genómicos y las características clínicas y biológicas	141

3.3. Correlación entre los cambios genómicos y la supervivencia de los pacientes con LDCGB	142
3.4. Asociación entre los cambios genómicos y la respuesta al tratamiento con el protocolo MegaCHOP	144
3.5. Distribución de los pacientes en LDCGB del CG y del No CG	146
CONCLUSIONES	153
BIBLIOGRAFÍA	157
APÉNDICES	191
Apéndice 1	193
Apéndice 2	201

INTRODUCCIÓN

1. LINFOMAS NO HODGKINIANOS

1.1. Concepto, historia y clasificación

Los linfomas son neoplasias malignas del sistema linfático derivadas de los linfocitos en cualquiera de sus estadios de diferenciación. Sus características morfológicas, inmunofenotípicas, genéticas y moleculares son heterogéneas por lo que su comportamiento biológico y clínico puede variar. Los linfomas se dividen en dos grandes grupos: linfomas de Hodgkin (LH) y linfomas no hodgkinianos (LNH) y éstos, a su vez, en neoplasias de células B (LNH-B) y en neoplasias de células T y de célula NK (*natural killer*) (LNH-T). Desde su definición como entidad clínica, los LNH se han clasificado de muchas maneras, sin que ninguna haya sido aceptada por toda la comunidad científica. La primera descripción de los linfomas se atribuye a Thomas Hodgkin en 1832.¹ Desde entonces se diagnosticaron un número creciente de enfermos con agrandamiento del bazo y de los nódulos linfáticos, caracterizados por una proliferación de los folículos linfoides.^{2,3} La primera clasificación morfológica fue propuesta por Gall y Mallory en 1941, en la que se reconocía al linfoma folicular (LF) como una entidad morfológica y clínicamente diferente.⁴ Desde entonces se han propuesto muchas clasificaciones, basadas en criterios anatomo-patológicos (Rapaport, Lukes y Collins, Lennert)⁵⁻⁷ o en criterios clínicos (“The Working Formulation”).⁸ En 1994 el *International Lymphoma Study Group* (ILSG) propuso la Clasificación REAL, que dividía los linfomas en tres grandes grupos: linfomas de células B; linfomas de células T y células natural Killer; y enfermedad de Hodgkin.⁹ Esta clasificación incluía, además de métodos de diagnóstico clásicos (clínica, morfología e inmunología), nuevas técnicas de diagnóstico como los estudios citogenéticos y los de biología molecular. La aceptación de esta clasificación ha sido facilitada por diversos estudios que demuestran su reproducibilidad y su significado clínico. Sin embargo, ha sido criticada por la ausencia de un enfoque clínico de tipo pronóstico.¹⁰

La clasificación REAL ha servido de base fundamental de la posterior división de los linfomas propuesta por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el año 2001, que ha sido revisada recientemente.¹¹⁻¹³ Esta clasificación integra las características morfológicas (como elemento básico), la inmunohistoquímica, las alteraciones genéticas y la clínica para definir entidades específicas, pero sin constituir ninguno de ellas por separado el único patrón para su definición. El diagnóstico surgirá de la valoración de dichos elementos combinados ya que existen características biológicas compartidas por más de un tipo de linfoma.¹³ La nueva clasificación de las neoplasias de células B de la OMS se adjunta en el Apéndice 1 (Anexo I).

1.2. Epidemiología de los LNH-B

Las neoplasias de células B constituyen el 90% de los LNH y representan cada año el 4% de los nuevos cánceres. Los tipos de linfomas más comunes son el LF y el linfoma difuso de células grandes (LDCGB), que juntos suponen más del 60% del total de los linfomas.¹⁴ Algunos tipos de linfomas descritos recientemente, como los linfomas marginales, constituyen el 10% de los linfomas. Los linfomas esplénicos de la zona marginal (LEZM) son una enfermedad rara, y afectan a menos del 1% de todos los enfermos con linfoma. El linfoma de Burkitt (LB) es una forma agresiva de LNH-B, normalmente diagnosticado en niños y adultos jóvenes, donde representa el 50% de los LNH-B, mientras que en los adultos sólo supone el 1% de los linfomas. La distribución de los LNH-B se recoge en la Figura 1.

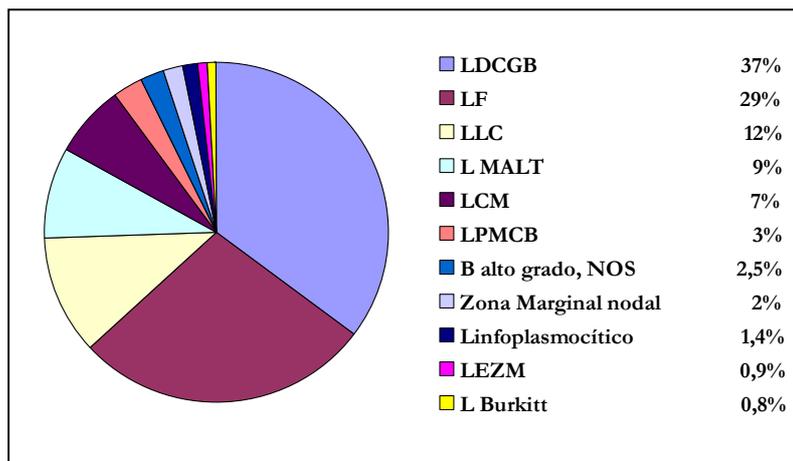


Figura 1. Distribución de los LNH-B. Hay diferencias significativas en la incidencia entre las diferentes regiones geográficas. LDCGB: linfoma difuso de células grandes B; LF: linfoma folicular; LLC: leucemia linfática crónica; L MALT: linfoma del tejido linfoide asociado a mucosas; LCM: linfoma de las células del manto; LPMCB: linfoma primario del mediastino de células B; LEZM: linfoma esplénico de la zona marginal. Los linfomas más frecuentes son el LDCGB y el LF.

1.3. Alteraciones genéticas de los LNH-B

1.3.1. Las traslocaciones en los LNH

El hallazgo de alteraciones citogenéticas relacionadas con los tumores hematológicos es conocido desde hace tiempo.¹⁵⁻¹⁹ En los LNH-B la presencia de traslocaciones se asocia con algunos tipos morfológicos y constituye una herramienta de primer orden para su clasificación (Tabla 1).

Tabla 1. Traslocaciones cromosómicas recurrentes en LNH-B, genes implicados y frecuencia.

Tipo de linfoma	Alteración	Gen	Frecuencia (%)
<u>LNH línea B</u>			
Linfoma Folicular	t(14;18)(q32;q21)	<i>IGH-BCL2</i>	90-80
Linfoma Burkitt	t(8;14)(q24;q32)	<i>MYC-IGH</i>	80
	t(8;22)(q24;q11)	<i>MYC-IGL</i>	10
	t(2;8)(p12;q24)	<i>IGK-MYC</i>	5
Linfoma Difuso de Célula Grande B	t(3;?)(q27;?)	<i>BCL6</i>	30
	t(14;18)(q32;q21)	<i>IGH-BCL2</i>	30-20
	t(8;14)(q24;q32)	<i>MYC-IGH</i>	10
Linfoma Difuso de Célula Grande B Primario del SNC	t(3;?)(q27;?)	<i>BCL6</i>	40-30
Linfoma de Célula Grande B ALK+	t(2;5)(p23;q35)	<i>ALK-NPM1</i>	50-30
	t(2;17)(p23;q23)	<i>CTCL-ALK</i>	
Linfoma de Células B Inclasificable, entre LDCGB y LB	t(8;?)(q24;?)	<i>MYC</i>	50-35
	t(?;18)(?;q21)	<i>BCL2</i>	15
Linfoma de Células del Manto	t(11;14)(q13;q32)	<i>CCND1-IGH</i>	90
Linfoma tipo Malt	t(11;18)(q21;q21)	<i>API2-MALT1</i>	30-50
	t(1;14)(p22;q32)	<i>BCL10-IGH</i>	5
	t(14;18)(q32;q21)	<i>IGH-MALT1</i>	5
	t(3;14)(p14.1;q32)	<i>FOXPI-IGH</i>	5

Así, los LF se caracterizan por la t(14;18)(q32;q21), los linfomas de las células del manto (LCM) por la t(11;14)(q13;q32), mientras que los LB se caracterizan por presentar una t(8;14)(q24;q32) o sus variantes: t(2;8)(p12;q24) y t(8;22)(q24;q21)²⁰ que desregulan la expresión de los genes, *BCL2*, *CCND1* y *C-MYC*, respectivamente.²¹ Estas traslocaciones suponen la fusión de genes y en la mayoría de los casos afectan a los genes de la cadena pesada (*IGH*) o ligeras (*IGK* o *IGL*) de las inmunoglobulinas. La detección ocasional de la t(14;18) en los individuos sanos refuerza la hipótesis de que, en ocasiones, sea necesaria la presencia de alteraciones secundarias para la progresión de los linfomas.^{22;23}

1.3.2. Alteraciones genéticas secundarias

La evolución tumoral es un proceso dinámico en el que a las alteraciones cromosómicas primarias se suman de forma secuencial otros cambios. Aunque son menos específicas que los cambios primarios, se piensa que las alteraciones secundarias no ocurren al azar pudiendo estar condicionadas por la alteración primaria o por el tipo de tumor.²⁴

El abanico de las alteraciones genómicas secundarias revela patrones característicos de inestabilidad genómica e incluye reordenamientos, pérdidas, ganancias y amplificaciones de diferentes regiones cromosómicas con implicación de genes importantes en el comportamiento biológico del tumor. En algunos linfomas un incremento del número de cambios secundarios puede estar asociado con el pronóstico del paciente y, además, estos eventos parecen influenciar en la evolución del tumor.²⁵ Los cambios secundarios inicialmente se identificaron por citogenética convencional. Sin embargo, durante la pasada década estos análisis se enriquecieron con el empleo de la hibridación genómica comparada (HGC), que sólo requiere ADN de la muestra tumoral y permite una fácil y fiable caracterización de los cambios cromosómicos permitiendo delimitar las regiones mínimas alteradas.

Más del 70% de los linfomas tienen alteraciones por HGC. La leucemia linfática crónica (LLC) es la neoplasia linfoide B con un menor número de enfermos con alteraciones (63%) y menos cambios genéticos por caso (2,5).²⁶ Por el contrario, el LCM presenta el mayor número de enfermos con alteraciones genéticas (93%) y mayor número de cambios por caso (mediana 5).²⁷ De acuerdo con la distribución y la frecuencia de las alteraciones secundarias los LNH-B pueden dividirse en dos grupos. Un primer grupo caracterizado por presentar una elevada frecuencia de alteraciones secundarias que incluye a los LCM, los enfermos con LDCGB, los LF y un segundo grupo que engloba al resto de los LNH-B.

En los linfomas se pueden producir distintos patrones de alteraciones cromosómicas secundarias (Tabla 2).

Tabla 2. Principales alteraciones genéticas secundarias en los LNH-B detectadas por HGC convencional

	<i>Ganancias %</i>								<i>Pérdidas %</i>							
	1q+	2p+	3q+	7p+	8q+	9p+	12q+	18q+	1p-	6q-	7q-	8p-	9p-	11q-	13q-	17p-
LDCGB-ABC	12	15	33	10	10	0	0	34	0	40	0	10	0	0	0	18
LDCGB-CG	10	17	0	15	11	0	33	10	0	22	0	0	0	0	0	0
LF	10	10	10	21	0	0	18	29	25	21	0	0	0	0	0	15
LEZM	11	0	31	0	0	0	18	11	0	10	16	0	0	0	0	10
LB	43	0	0	0	0	0	26	0	0	0	0	0	0	0	17	0
LLC	0	0	0	0	0	0	65	0	0	0	0	0	0	24	65	32
LCM	0	0	70	27	32	0	30	26	33	37	0	33	30	36	63	30
LPMCB	0	47	16	0	11	56	0	16	0	0	0	16	0	0	0	0

LDCGB-ABC: linfoma difuso de células grandes de células B activadas; LDCGB-CG: linfoma difuso de células grandes del centro germinal B; LF: linfoma folicular; LEZM: linfoma esplénico de la zona marginal; LB: linfoma de Burkitt; LLC: leucemia linfática crónica; LCM: linfoma de las células del manto; LPMCB: linfoma primario del mediastino de células B

En muy pocas ocasiones las alteraciones secundarias son específicas de un tipo de LNH-B. Sin embargo, las pérdidas en 7q y las ganancias en 9p son características de los LEZM y de los linfomas primarios del mediastino (LPMCB), respectivamente. Las pérdidas del cromosoma 7q se detectan en el 16% de los LEZM mediante HGC, pero esta incidencia aumenta hasta más del 40% cuando se analiza la región 7q23-q32 mediante técnicas moleculares.²⁸ Las ganancias en 9p se observan en el 56% de los LPMCB mediante HGC y en el 70% mediante arrays genómicos.²⁹ Cabe reseñar que las pérdidas en 10q23-q24, aunque sólo se producen en el 10% de los LF, parecen ser específicas de estos linfomas.³⁰ Sin embargo, la mayoría de las alteraciones secundarias no son específicas de un tipo de neoplasia linfoide B. Así, tanto en los LCM como en las LLC se puede producir una pérdida en 11q21-q23 y la pérdida de 13q es común a la LLC, los LCM y los LB.³¹⁻³³ Cabe destacar que en muchas de estas regiones alteradas se localizan genes supresores tumorales y oncogenes como *TP53* en 17p13.1, *CDKN2A* y *CDKN2B* en 9p21 y *RB* en 13q14.³⁴

1.4. Repercusión clínica de las alteraciones cromosómicas en los LNH-B

En la mayoría de los linfomas el incremento en el número de alteraciones cromosómicas se ha asociado con peor pronóstico (Tabla 3). Además, algunas alteraciones secundarias comunes en los cromosomas 1, 6, 9 y 17 se han asociado con una supervivencia más corta, sugiriendo que pueden incluir genes que son cruciales para la progresión del tumor. El cambio genético más frecuente asociado con una menor supervivencia, mayor progresión y recaída, así como con resistencia a fármacos, es la pérdida de 17p, que supone la pérdida del gen *TP53* y que puede asociarse con la mutación de este gen.³⁵⁻⁴³

Tabla 3. Alteraciones genómicas detectadas en los LNH-B relacionadas con el pronóstico.

LNH-B	Cambio genómico	Pronóstico	Referencia
LF	-6q25-q27	Peor	44
LCM	+3q, -8p, -9p, -9q, -13q14	Peor	45, 46, 47, 48, 49
LDCGB	+18q21	Peor	50, 51
LLC	-13q14	Mejor	23, 52

LF: linfoma folicular; LCM: linfoma de las células del manto; LDCGB: linfoma difuso de células grandes B; LLC: leucemia linfática crónica.

En los LF las pérdidas de 6q25-q27 se han relacionado con supervivencia corta como factor pronóstico independiente.⁴⁴ En los LCM las ganancias en 3q y las pérdidas en 8p, 9p (normalmente con la pérdida de *CDKN2A*), 9q y 13q14 se han asociado con una menor supervivencia.⁴⁵⁻⁴⁹ La asociación de las pérdidas en 13q14 y la corta supervivencia en los LCM contrasta con la situación en las LLC donde las pérdidas en esta región se asocian con mejor pronóstico.^{23;52} En los LDCGB las ganancias o amplificaciones de 18q21, incluyendo a los genes *BCL2* y *MALT1*, están asociadas con una supervivencia más corta y un elevado riesgo de recaída.^{50;51}

2. ANÁLISIS GENÉTICO POR MICROARRAYS

Los estudios genéticos clásicos se han basado en el análisis citogenético y de hibridación “in situ” fluorescente (HISF). En los linfomas, los estudios mediante citogenética convencional son laboriosos y han sido poco frecuentes debido a la dificultad en la obtención de mitosis analizables y a la necesidad de experiencia en la interpretación de los cariotipos. La incorporación de la hibridación genómica comparada (HGC) en 1992 supuso un avance considerable en la comprensión de las alteraciones genéticas de estas enfermedades.⁵³ En la última década la técnica de los arrays genómicos (CGH-array o Array-CGH) ha permitido conocer con más profundidad los cambios genómicos presentes en el cáncer. Esta metodología combina la resolución de la HISF y la capacidad de analizar todo el genoma de la HGC. Por consiguiente, el array genómico es una herramienta muy válida para el análisis de los cambios en el número de copias del ADN, para la localización e identificación de regiones genómicas o de genes relacionados con la enfermedad y con posibilidades de ser utilizada en la clasificación del cáncer.⁵⁴⁻⁵⁷

2.1. Array Genómico

2.1.1. Concepto

En los arrays genómicos las metafases de los cromosomas usadas en la HGC convencional son reemplazadas por fragmentos clonados de ADN ($\pm 100-200$ kb) de los que se conocen su localización exacta gracias al Proyecto Genoma Humano (HUGO, *International Human Genome Sequencing Consortium 2001*).⁵⁸⁻⁶¹ La localización física de cada uno de los fragmentos de ADN clonados, que en ocasiones se solapan, dan lugar al mapa físico de cada uno de los cromosomas. La cartografía del genoma humano requiere la disponibilidad de librerías de clones de ADN en los vectores apropiados. En un principio las librerías se insertaron en YAC (cromosoma artificial de levadura), que permitían clonar

fragmentos de más de 500 Kb.⁶² Sin embargo, presentaban dificultades de manipulación y grandes lagunas genómicas⁶³⁻⁶⁵ por lo que el sistema de clonación de BAC (cromosoma artificial de bacteria) fue una alternativa ideal y se usó en la mayoría de los laboratorios.⁶⁶ El sistema de los BAC está basado en el “vector de clonación F” de *Escherichia coli*, cuya replicación está estrictamente controlada por lo que el plásmido F se mantiene en bajo número de copias (una o dos copias por célula) reduciendo su potencial de recombinación entre los fragmentos de ADN del plásmido.⁶⁷ Hay otros sistemas para la clonación de fragmentos largos como es el sistema basado en el bacteriófago P-1 (PAC),⁶⁸ sin embargo, la capacidad máxima de clonación de este vector es de 100 Kb. Por el contrario, el tamaño de los clones de BAC (150 Kb), además de conferir una unión consistente y específica a la superficie del array, hace posible determinar con más precisión el número de copias, lo que les hace muy apropiados para emplearlos como sondas de CGH-array.^{54;55;69}

2.1.2. Ventajas

1. Los arrays genómicos no requieren células en división como ocurre con las técnicas de cariotipo. Además, permiten el análisis de todo el genoma en un solo experimento, lo cual se puede comparar con la realización de miles de estudios de HSF independientes.⁷⁰
2. Tienen una resolución alta, su mayor ventaja con respecto a la HGC convencional. La resolución estándar varía entre 1 y 5 Mb, pero puede incrementarse a aproximadamente 400 Kb suplementando el array con clones extras.⁷¹⁻⁷³
3. El bajo número de señales de falsos positivos y en muchos casos ningún falso negativo dan lugar a una alta especificidad y con una sensibilidad también muy elevada.^{71;72;74}
4. Es una metodología rápida porque parte del procedimiento está semiautomatizado.⁷¹

2.1.3. Desventajas de los arrays genómicos

1. No detectan alteraciones recíprocas, como son las traslocaciones y las inversiones, por lo que no detectan fusiones génicas.
2. Es preciso que la muestra analizada tenga al menos entre un 30% y un 50% de células tumorales.⁷⁵
3. La hibridación debe ser de una calidad excelente para que los resultados obtenidos no se vean afectados por la señal producida por el ruido de fondo.⁷⁶
4. Los polimorfismos en el genoma contribuyen sustancialmente a la variación genética en la población.⁷⁷ Por tanto, la aplicación de los arrays genómicos al diagnóstico conlleva un conocimiento en la localización, frecuencia e implicaciones de los polimorfismos genéticos. Existen varias páginas webs que se pueden consultar para detectar los polimorfismos descritos por los arrays genómicos: <http://www.sanger.ac.uk/PostGenomics/decipher/>; <http://www.genome.ucsc.edu/> y <http://www.projects.tcag.ca/variation/>. Aunque los polimorfismos complican la interpretación del análisis de los arrays genómicos la mayoría no tienen significado patológico.^{78;79}
5. La cantidad necesaria de ADN para llevar a cabo la hibridación podría ser un problema práctico. Los primeros arrays genómicos precisaban de al menos 2 µg de ADN. Esta cantidad ha ido disminuyendo y en la actualidad sería posible hacer análisis de arrays genómicos a partir de menos cantidad de ADN ya que la posibilidad de su amplificación reduce considerablemente la cantidad necesaria.⁷⁹⁻⁸¹ Asimismo, se ha demostrado la posibilidad de realizar arrays genómicos usando ADN de células separadas, aisladas desde líquido amniótico o con el ADN de una única célula.^{82;83} Incluso es posible extraer el ADN de muestras patológicas archivadas, normalmente fijadas en formalina e incluidas en parafina y almacenadas durante varios años, para hibridarlo en un array genómico.^{78;84;85}

Por último, es preciso reseñar que las ventajas y las limitaciones de los arrays genómicos dependen de la plataforma elegida. Por ello, tanto la cantidad de clones depositados en el portaobjetos como la manera de amplificarlos es crucial para la sensibilidad final y la calidad del análisis. El uso de clones de grandes insertos como son los BAC y PAC proporcionan una intensidad de señal suficiente para detectar cambios en una sola copia y las alteraciones pueden ser inmediatamente relacionadas con los marcadores genéticos.⁵⁹

2.2. Arrays genómicos en los LNH-B

Los arrays genómicos se han empleado en el estudio de enfermedades no oncológicas, como el retraso mental, las anomalías congénitas, el autismo, la detección de nuevos síndromes y el diagnóstico prenatal.⁸⁶⁻⁹⁰ Además se han aplicado al estudio de muchos tipos de cáncer.⁷⁹

El uso de arrays genómicos ha permitido definir nuevas regiones implicadas en las neoplasias linfoides de células B. Estos estudios se han centrado en la descripción de las alteraciones genéticas en los LDCGB, los LCM y los LF. Sin embargo, no han determinado la posible influencia de estas alteraciones en las características clínicas de los linfomas y en su curso clínico. Las principales regiones alteradas en los linfomas se recogen en la Tabla 4.

Tabla 4. Alteraciones detectadas por CGH-array en los diferentes tipos de LNH-B.

LNH-B	N°	Tipo de Array	Alteraciones			Referencia	
			Ganancias		Pérdidas		
LDCGB	13	496 BAC/PAC	18q21 12q12-q24 9p13-q24 2p13			91	
LDCGB	70	2.088 BAC/PAC	1q21.2-q32.2 3p25.2-q29 5p13.1-p13.2 6p21.1-p25.3 7p22.2-q31.1	8q24.13-q24.21 11q23.2-q24.3 12q13.2-q21.2 16p13.3 18	1p36.31-p36.32 3p14.2 6q14.1-q27 9p21 17p13.3-p11.2	92	
LDCGB	66	Array específico 3p14.2 (<i>FHIT</i>)			3p14.2	93	
LDCGB	17	Array específico 6p21 (<i>CCND3</i>)	6p21			94	
LDCGB	99	2.304 BAC/PAC	3p23-q28 18q11.2-q23 19q13.41-q13.43		ABC 6q22.31-q24.1 9p21.3 CG	95	
LDCGB	64	1.552 BAC/PAC 2.621 BAC	1q21.1-q23.3 1q31.1-q42.13 2p15-p16.1	7q22.1-q36.2 12q13.1-q14		96	
LDCGB	116	2.799 BAC/PAC	18q21		1 10q21.1	51	
LB	28	Agilent 44K y 244K	1q21-q25 1q32.1 1q44 2p 7q	8 11q 13q31.3-q32.1 15q	3p 4 6 9p	11p 13q 14q12-q21.3 17p	97
LMPCB	37	2.799 BAC	2p15 1q22		6p21.3 3p23-p25	11q13.3 8p	98
LCGBP cutáneo	31	3.500 BAC	12q13-q14 10q24.2 7q21-q22		6q		99
LDCGB primarios nodales	42	5.000 BAC	2p23 5p15 8p12 8q24 13q31	15q24 17q 18p11 20q13	1p13 4p16	4q12 9p24	100
LF transformados a LDCGB	49	2.460 BAC/PAC	9p23 6p12-p21	17q21 12	1p36	11q24-q25	80
LF	106	26.819 BAC	6p 7q32	12q13 17q	1p36 6q21-q24		101
LF	128	2.500 BAC	18q		11q13 9p21	11q23	102
Líneas Celulares LCM, LDCGB, LB y mediastínicos	40	2.460 BAC/PAC	18q21.3				103
Líneas Celulares LCM	8	32.433 BAC	12		9p		104
LCM	49	1.456 BAC/PAC	3q26-q29 6q14 8q24 10p13 11q13	11q23 12p11 12q13-q15 18q21-q22	1p21 6q25-q26 8p21 9p21-p22 9q13-q22 9q34	10p14-p15 11q22-q23 13q14 13q33-q34 17p11-p13	46
LCM	36	2.348 BAC/PAC	3q26.1 6p25.3 7p21.1-p21.2	8q21.3-q24.21 10p12.1-p12.2 17q23.2-q24.1	1p36.23-p36.32 1q42.2-q43 2p11.2	2q13 17p13.3 19p13.2-p13.3	105
LCM	68	2.460 BAC/PAC	8p11.2 9p24		9q21-q22 10p24 17p13.3		47
LCM Líneas celulares	5	455 BAC	13q34-qter 18q21.1-q21.33		11q23.3-qter 17q21.2-q22.2		106
LNH-B Líneas celulares	48	2.400 BAC/PAC	1q21.2-q25.1 7p11.2-p22.3 7q21.13-q22.1 8q24.1	12q13.13 13q31.3-q32.3 18q21.1-q21.32	6q23.2-q24.1 8p21.3	9p21.3-p22.1 17p13.1-q11.2	107
LNH-B bajo grado	87	44.000	2p16 3q26-q29 8q24	12q13 18q21	6q 11q23 13q14	17p13 19q13.12	30

LDCGB: linfoma difuso de células grandes; LB: linfoma de Burkitt; LMPCB: linfoma primario del mediastino de células B; LCGBP cutáneo: linfoma de célula grande B primario cutáneo. LF: linfoma folicular; LCM: linfoma de las células del manto; LNH-B: linfoma no-Hodgkin de células B.

Cabe destacar que los LDCGB se observan ganancias de regiones que contienen los genes *BCL2*, *MDM2*, *JAK2* y *REL*. En cuanto a las regiones perdidas, destaca 3p14.2, con afectación del gen *FHIT*, por lo que se ha sugerido que la pérdida de este gen, que suele asociarse con una transcripción anormal, puede estar involucrada en la progresión tumoral.⁹³ Además, en los LDCGB se ha descrito la ganancia de 6p21, con implicación del gen *CCND3*. La ganancia de este gen ocasiona una regulación aberrante del ciclo celular y puede contribuir al desarrollo tumoral.⁹⁴ Cuando se analizan de forma separada los LDCGB de tipo ABC (células B activadas) y de tipo CG (centro germinal) se comprueba que cada uno de ellos se asocia con alteraciones específicas (Tabla 4).⁹⁵ Los LDCGB también pueden observarse ganancias en 18q21 y en los cromosomas 20 y 2, incluyendo a los genes *REL* y *BCL11A*, así como pérdidas en los cromosomas 1 y 10q21.1.^{51;96}

Estos hallazgos son distintos a los observados en los LF transformados a LDCGB donde predominan las ganancias en 9p23, 6p12-p21 y 17q21 y las pérdidas en 11q24-q25 y 1p36.3. Sin embargo, la trisomía del cromosoma 7, que previamente se había descrito como una alteración asociada a la transformación, sólo se observó en un enfermo en otra serie.⁸⁰ Los estudios de CGH-arrays también han demostrado que las ganancias en 6p, 7q32 y 12q13, así como las pérdidas en 1p36 eran predictores del riesgo de transformación de LF a LDCGB¹⁰¹ o que los LF con deleciones en 9p21 y en 6q26 tenían una supervivencia más corta.¹⁰²

Las alteraciones genéticas se observan en el 95% de los enfermos con LCM y las pérdidas son más frecuentes que las ganancias. En los LCM suelen observarse pérdidas en 8p21, que contiene algunos genes de la familia de receptores *TRAIL*; pérdidas en 11q23, con afectación de *CCND1* y del gen *RELA*, así como pérdidas en 10p12, donde se ubica el gen *BMI1*.^{46;108-112} Además, se ha observado una pérdida en 2q13, donde se sitúa el gen *BIM*, por lo que este gen podría relacionarse con la patogénesis de los LCM.¹⁰⁵ En los LCM las ganancias suelen situarse en 8p11.2, gen *FGFR1*, y 9p24, *JAK2*.^{47;106}

En resumen, son varias las publicaciones que confirman la importancia de realizar arrays genómicos en el estudio de los LNH-B. Sin embargo, algunos tipos de linfomas, como los LEZM han sido poco estudiados por esta metodología,^{30;113;114} y tampoco se dispone de datos que relacionen las alteraciones observadas en los linfomas con las características clínicas de la enfermedad en enfermos tratados de manera homogénea.

3. LINFOMA ESPLÉNICO DE LA ZONA MARGINAL

El linfoma esplénico de la zona marginal (LEZM) es un subtipo de linfoma indolente poco frecuente. El término de LEZM fue usado por primera vez en 1992 para definir un tipo de linfoma de células B de bajo grado con un patrón micronodular peculiar que afecta al bazo.¹¹⁵ En la clasificación REAL, los LEZM se consideraron como una entidad provisional, y se incluyeron junto con los linfomas MALT (linfomas asociados a mucosas) y con los linfomas de la zona marginal en la categoría de linfomas de la zona marginal.^{9;116} La reciente clasificación de la OMS, define a los LEZM como una neoplasia de células B, compuesta de linfocitos pequeños que rodean y sustituyen a la pulpa blanca del centro germinal, borrando el manto folicular y fusionándose con la zona periférica.¹⁴ En la actualidad se les considera como un subgrupo de LNH-B específicos con características propias.

3.1. Características clínicas

Los enfermos suelen presentar una esplenomegalia masiva asociada con infiltración en médula ósea y sangre periférica. La presencia de linfadenopatía periférica y la infiltración de otros órganos al diagnóstico es excepcional, aunque pueden desarrollarse a lo largo de la enfermedad.¹¹⁷ La mayoría de los pacientes tienen más de 50 años, sin predominio de sexo. A veces hay anemia o trombocitopenia autoinmune y una presencia variable de linfocitos vellosos en sangre periférica.¹⁴ El curso clínico de la enfermedad suele ser crónico y la mediana de supervivencia se sitúa alrededor de 10 años.¹¹⁸⁻¹²³ Más de una tercera parte de los

pacientes que mueren lo hacen por causas no relacionadas con la enfermedad como son las neoplasias secundarias o procesos vasculares.¹²⁴ Aproximadamente el 10% de los casos se transforman a linfomas difusos de células grandes.¹²⁵

3.2. Diagnóstico de los LEZM

El diagnóstico está basado en la morfología de los linfocitos, el inmunofenotipo, los cambios citogenéticos, la histología de la médula ósea y la histología del bazo.^{9;11;126-129}

3.2.1. Morfología de los LEZM

En la Tabla 5 se recogen los principales datos en los que se basa el diagnóstico de los LEZM.

Tabla 5. Características principales de los LEZM.

<p>Sangre periférica (SP) Linfocitos circulantes con núcleo redondeado con cromatina condensada y citoplasma basófilo con prolongaciones. Existe un cierto grado de heterogeneidad morfológica caracterizado por la presencia de: 1.-células linfoides pequeñas sin ninguna característica 2.-células linfoplasmocitoides 3.-linfocitos con fisuras nucleares o células linfoides de tamaño medio con abundante citoplasma claro. Es raro observar linfoplasmocitos o células plasmáticas. La presencia de células grandes con cromatina inmadura normalmente está relacionada con progresión o con transformación a linfoma de células grandes. El término de LEZM con linfocitos vellosos (LELV) es un indicador de la manifestación en sangre de los LEZM. Sin embargo, dado que hay LEZM sin linfocitos vellosos circulantes o que pueden perderse por el almacenamiento de la muestra en anticoagulante, la OMS recomienda el uso del término de LEZM con +/- linfocitos vellosos.^{129;130}</p> <p>Médula Ósea (MO) En las fases iniciales de la enfermedad la infiltración de la MO es escasa, inferior al 20%. El patrón de infiltración es intrasinusoidal y con la progresión después de la esplenectomía, se hace nodular¹³¹ aunque no es específica.¹³² Los folículos preservan el borde del centro germinal con una corona de células de la zona marginal.^{130;133}</p> <p>Histopatología del bazo Macroscópicamente un corte de la superficie del bazo muestra un patrón típico multimicronodular. Los nódulos tumorales están compuestos por una zona interior central con linfocitos pequeños de núcleo redondeado o ligeramente irregular y una zona más externa con células de tamaño medio y citoplasma claro localizadas en la zona marginal o zona de proliferación. Estas dos regiones confieren al nódulo tumoral un patrón bifásico. Dentro de la zona externa hay células grandes dispersas con un gran núcleo y un nucleolo predominante. En muchos de los casos está involucrada la pulpa roja. Los sinusoides y senos vasculares están normalmente infiltrados.^{115;127;134;135} En ocasiones los LEZM pueden mostrar diferenciación plasmocítica con paraproteinemia monoclonal¹³⁶ caracterizada por la presencia de células linfoplasmocitoides o células plasmáticas que expresan el mismo tipo de inmunoglobulina que los linfocitos tumorales. Estas células linfoplasmocitoides o células plasmáticas están localizadas en la zona marginal ocupando los centros germinales.^{123;137;138}</p> <p>Inmunofenotipo de los LEZM Las células tumorales expresan: IgM en su superficie y a veces IgD CD20+, CD79a+, CD5-, CD10-, CD23-, CD43- y anexina A1-.^{126;130} CD103 normalmente es negativo Ciclina D1 es ausente.^{14;139} CD5 y/o CD43+ (10 y 15%), CD23-. El 10% de los LEZM se pueden transformar a LDCGB, presentando aumento de bcl6 y MUM1. Si la diferenciación plasmocitaria está presente, las células plasmáticas tienen reducida las cadenas ligeras y normalmente expresan CD38 y/o CD138.¹⁴⁰</p>
--

3.2.2. Inmunofenotipo

Las características inmunofenotípicas de los LEZM están resumidas en la Tabla 6. Es destacable la expresión de CD20 y de IgM/IgD así como la ausencia de expresión de CD23 y CD10.^{123;137;138;141;142}

Tabla 6. Inmunofenotipo de los linfocitos B clonales en los LEZM.

	Expresión	NO Expresión	Variante Linfoplasmocítica	Transformación LDCGB
SP	IgM	CD20	CD23	
	IgD	CD22	CD5	
	IgG	CD24	CD103	
	IgA	CD27	CD25	
	FMC7	CD79b		
		DBA44		
MO	CD20		Ciclina D1	
	CD45RA		CD10	
	bcl2		bcl6	
	CD5		CD23	
BAZO	IgM	p27	Ciclina D1	CD23
	IgD		CD10	CD43
	CD20	Pax5		CD38
	DBA44	bcl2	bcl6	CD138
			CD5	bcl6
			MUM1	

SP: Sangre periférica; LDCGB: linfoma difuso de célula grande B.

3.2.2. Alteraciones genéticas

La mayoría de los LEZM (80%) presentan alteraciones citogenéticas.¹²⁹ Los cromosomas que se afectan con mayor frecuencia son el 1, 3, 6, 7, 8, 12 y 14. Los cambios citogenéticos más frecuentes son las ganancias en 3q (20-30%) o en 12q (15-20%) así como las pérdidas en 7q22-q36, frecuentemente en la banda 7q32 (30-40%), que en ocasiones es la única alteración genética presente en los LEZM. La región consenso delecionada en 7q se localiza entre 7q32 y 7q35. La mayor incidencia de esta pérdida genética se encuentra en la banda de 7q32 aunque se han identificado pérdidas de diferentes regiones tanto centroméricas como teloméricas a esta región.¹⁴³⁻¹⁵¹ Estos resultados se han confirmado por estudios de HSF y de pérdida de heterocigosidad (LOH), que han demostrado que la pérdida parcial del brazo largo del cromosoma 7 es el cambio más frecuente en los LEZM y que la región perdida se encuentra en D7S487 (40%)^{146;152-155} (Figura 2).

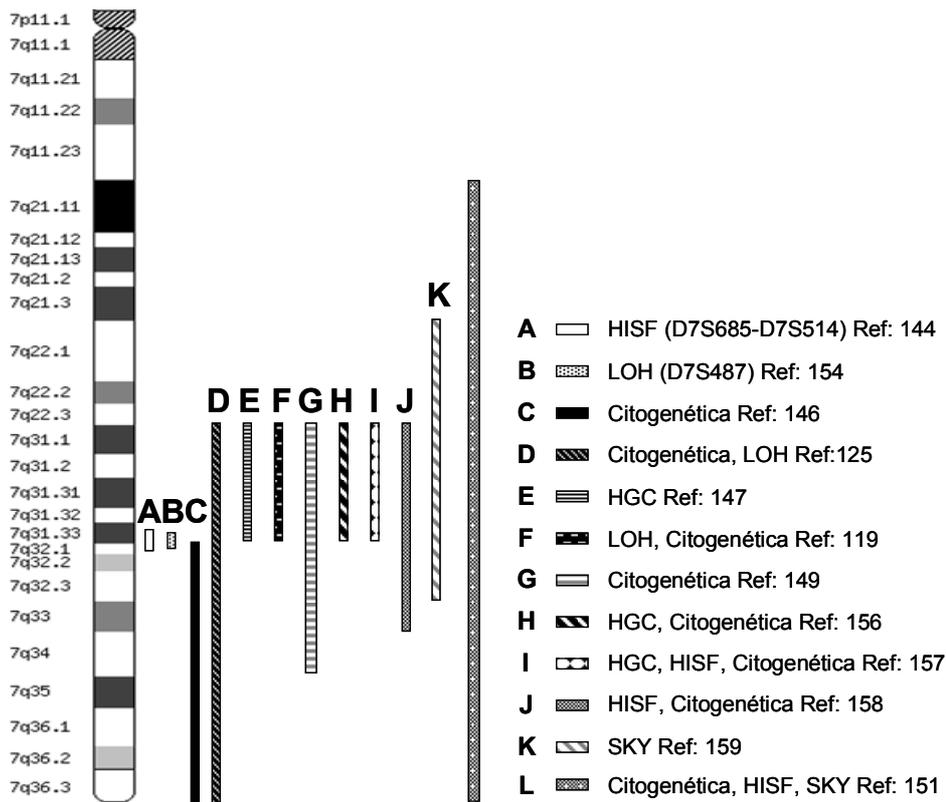


Figura 2. Representación esquemática de las pérdidas localizadas en el brazo largo del cromosoma 7 detectadas mediante citogenética, pérdida de heterocigosidad (LOH), hibridación genómica comparada (HGC) e hibridación "in situ" fluorescente (HISF).

A diferencia de los demás linfomas, en los LEZM no son comunes las traslocaciones que afectan a los genes de las inmunoglobulinas. Los estudios de HISF multicolor han confirmado los resultados de la citogenética y de la HISF y han puesto de manifiesto la presencia de traslocaciones de los cromosomas 3, 14, 6, 12, 9 y 8.^{151;159}

Los LEZM han sido poco estudiados por arrays genómicos. En una serie de 15 enfermos se observó que el 73% de los pacientes analizados tenían alteraciones genómicas. Las ganancias se situaban en 3q26.33-q29 (20%) y 12q13.11-q15 (13%) mientras que las pérdidas afectaban a 22q11.22 (13%), 13q14.2-q14.3 (11%), 16p13.3 y 16p12.2-p12.1 (7%). En el cromosoma 7 se ha podido delimitar una región comúnmente alterada en 7q31.32-q34 con un tamaño de 22,5 Mb y con una incidencia del 40%.³⁰ En otra serie de 8 LEZM se detectó que el 75% de los pacientes mostraban cambios genómicos, con ganancias en los

cromosomas 9p13.2-p21.1, 12, 13q22.2-q33.3 y 16p13.3 y pérdidas en 14q23-q24. La región comúnmente delecionada se situó en 7q31.33 en el 38% de los pacientes analizados.¹¹³ Mas recientemente, se ha analizado mediante un BAC-array de densidad media y un BAC-array de alta resolución para los cromosomas 6, 7, 8, 9, y 18 (1780, 1514, 1358, 987 y 697 BAC/PAC clones respectivamente) una serie de 25 LEZM. El 92% de los pacientes analizados tenían alteraciones genómicas, siendo la más frecuente la pérdida en 7q y delimitando la región mínima alterada en 7q32.1-q32.34, con un tamaño de 3,4 Mb. Otras alteraciones frecuentemente detectadas fueron las ganancias en 3q36.2-q28, 8q24.3-qter, 9q34, 12q23-q24 y 18 así como las pérdidas en 6q, 8p y 17p.¹¹⁴ (Tabla 7)

Tabla 7. Alteraciones genéticas más frecuentes en los LEZM detectadas por citogenética, pérdida de heterocigosidad (LOH), hibridación genómica comparada (HGC), hibridación “in-situ” fluorescente (HISF), HISF multicolor y CGH-array.

Publicación	Nº Casos	Metodología	Ganancias		Pérdidas	
			Región	%	Región	%
146	n=47	Citogenética/HISF	3q	33	7q32 3p23 1p32	36 18 12
125	n=7	Citogenética/LOH			7q 1q32	43 29
147	n=29	HGC	3q23-q25 5q13-q15 12q15-q21 20q 9q31	31 28 24 24 21	7q31-q32 17p 8p 13q 15q	10 10 7 7 7
119	n=32	Citogenética/LOH			7q31-q32	31
149	n=14	Citogenética	3q		7q31-q34	29
155	n=13	Citogenética/LOH/HGC	X 3 18	31 23 23	7q31-q32 6q 17p11	31 15 15
156	n=20	HGC	3q25-qter 12q13-q15	20 20	7q31 6q23 14q22-q24	25 20 10
157	n=29	Citogenética/HISF	3q 12q 5q	19 10 10	7q31-q33 6q 13q 17p	21 10 10 10
158	n=23	SKY	3 18 7	34 26 17	7q22-q32 17p 6	39 26 9
30	n=15	CGH-array	3q26.33-q29 12q13.11-q15	20 13	7q31.32-q34 22q11.22 13q14.2-q14.3	40 13 11
113	n=8	CGH-array	9p13.2-p21.1 12 13q22.2-q33.3 16p13.3	13 13 13 13	7q22-q36 7q31-q36 7q31.33 14q23-q24	13 13 13 13
114	n=25	CGH-array	3q26.2-q28 8q24.3-qter 9q34 18	32 20 20 12	7q32.1-q32.34 6q 8p 17p	44 16 12 8
151	n=330	Citogenética/HISF	3/3q 18 12	25 10 8	7q 6q 11q	38 12 5

4. LINFOMA DIFUSO DE CÉLULA GRANDE B

Los linfomas difusos de células grandes B (LDCGB) son una neoplasia de linfocitos B grandes con el núcleo igual o mayor que el de un macrófago o dos veces más grande que el de un linfocito normal, con un patrón de crecimiento difuso. Los LDCGB se han dividido en subgrupos en relación con variantes anatómicas, morfológicas, moleculares e inmunofenotípicas. Sin embargo, la mayoría de los LDCGB constituye un subgrupo específico, incluido en el grupo de LDCGB no especificados en otra categoría.¹⁴ (Tabla 8)

Tabla 8. Clasificación de los LDCGB según la OMS (2008)

Clasificación de la OMS de los LDCGB (2008)
LDCGB no especificado en otra categoría
Subtipos de LDCGB
Linfoma de célula grande B rico en células T
LDCGB primario del SNC
LDCGB primario cutáneo
LDCGB EBV positivo de ancianos
Otros linfomas de células B grandes
LCGB primario del mediastino
LCGB intravascular
LDCGB asociado con inflamación crónica
Granulomatosis linfomatoide
LCGB ALK positivo
Linfoma plasmoblástico
LDCGB: linfoma difuso de célula grande B; SNC: sistema nervioso central; LCGB: linfoma de célula grande B; EBV: Epstein-Barr virus

Los LDCGB son el 25-30% de los LHN-B. Se observan con más frecuencia en hombres ancianos, con una mediana de edad de 70 años aunque también pueden afectar a niños y jóvenes.¹⁴

4.1. Perfil de expresión génica: Arrays de expresión

La aplicación de los arrays de expresión al estudio de los LDCGB, ha permitido diferenciar grupos con unas características biológicas y un pronóstico diferente y ha abierto

un campo conceptual donde los factores moleculares pueden tener una gran relevancia en el estudio de los linfomas. El perfil de expresión génica (PEG) global de los LDCGB difiere del perfil de otras poblaciones de células B o de otros tipos de linfomas e identifica dos grupos distintos de LDCGB, los linfomas del centro germinal (LDCGB-CG) y los linfomas de células B activadas (LDCGB-ABC).¹⁶⁰ Este hallazgo ha sido confirmado posteriormente en un grupo más amplio de linfomas donde además se describió un tercer grupo de LDCGB denominado LDCGB Tipo 3.¹⁶¹

Los LDCGB-CG se caracterizan por la expresión de genes de células B normales del CG (*BCL-6*, *CD10*, *CD38*), por la traslocación de *BCL-2* y la amplificación de *c-REL*. Por el contrario, los LDCGB-ABC expresan genes que normalmente se inducen durante la activación *in-vitro* de las células B de sangre periférica. El perfil de expresión génica en este grupo afecta a genes que suelen estar traslocados en neoplasias linfoides como *IRF4* (*MUM1*); genes antiapoptóticos (*FLIP* y *BCL2*); y genes característicos de las células plasmáticas. Cabe destacar que la sobreexpresión de *BCL-2* en este grupo no está relacionado con su traslocación. El tercer grupo no expresa genes característicos de ninguno de los otros dos.¹⁶⁰⁻¹⁶²

4.2 Inmunohistoquímica en los LDCGB

Los LDCGB generalmente expresan CD19, CD20, CD22, CD79a y Pax5. Las inmunoglobulinas de superficie o citoplasmáticas, IgM, IgG e IgA están presentes en el 50-75% de los casos siendo la más frecuente IgM.¹⁶³ (Tabla 9).

Tabla 9. Marcadores inmunohistoquímicos de los LDCGB

Tipo	Marcador
Marcadores de células B	CD19, CD20, CD22, CD79a y Pax5
Superficie/Citoplasmáticas	Ig (IgM > IgG > IgA)
Variante anaplásica	CD30 variable
Otros marcadores	CD10 40%
	BCL-6 60%
	BCL-2 50%
	CD43 20%
	CD5 <10%
	CD30+ 10%
	MUM1 40%
	P53 30%
	Ki67 40-60%

Ig: inmunoglobulina

Dado que los estudios de los PEG no se pueden realizar en el diagnóstico diario de los LDCGB, se han realizado varios estudios basados en técnicas inmunohistoquímicas para la identificación de estos grupos de LDCGB.¹⁶⁴⁻¹⁶⁶ La mayoría de estos análisis han utilizado como marcadores de células B del centro germinal (CGB) los anticuerpos para las proteínas CD10 y BCL6 debido a que frecuentemente se han observado sobreexpresados, entre el 40 y el 60%, en los LDCGB-CG.¹⁶⁷⁻¹⁷⁰ Hay que destacar que la expresión de la proteína BCL-6 no está relacionada con los reordenamientos genéticos.^{167;168} Como marcador de células B que no pertenecen al centro germinal (no-CGB) se ha utilizado el anticuerpo para la proteína MUM1/IRF4 cuya expresión puede observarse en el 40-50% de estos linfomas.^{165;166;171} (Figura 3)

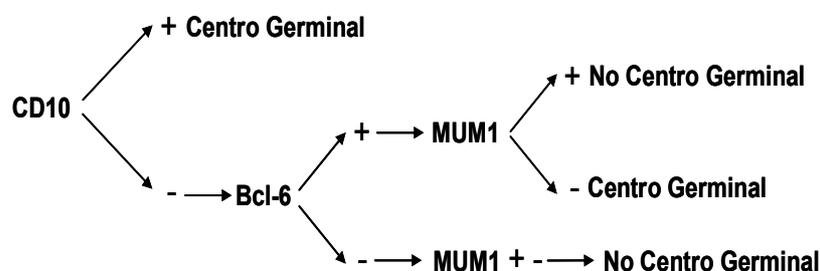


Figura 3. Algoritmo propuesto por Hans y cols¹⁶⁶ para clasificar a los LDCGB en CG y No-CG según la inmunohistoquímica.

Posteriormente se propuso otro algoritmo para la clasificación de los LDCGB basado en la expresión de la proteína Bcl-2. Esta proteína antiapoptótica se expresa en más del 80% de los LDCGB. A pesar de que no existen claras diferencias en su expresión entre los del CG y los ABC, el mecanismo de la expresión de esta proteína es distinto en ambos grupos. Los LDCGB-CG están frecuentemente asociados con la t(14;18)(q32;q21) que coloca al gen *BCL-2* bajo el control del gen *IgH*, originando su sobreexpresión. Además, la elevada expresión de Bcl-2 puede incluso resultar de la amplificación del gen, un fenómeno que se observó en más del 30% de los LDCGB-ABC.¹⁷² (Figura 4)

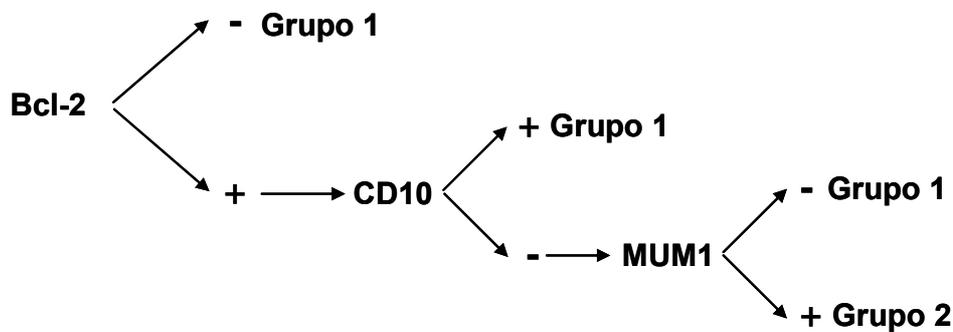


Figura 4. Algoritmo alternativo al propuesto por Hans para la clasificación de los LDCGB en pronóstico favorable (grupo 1) y no favorable (grupo 2).

4.3. Alteraciones genómicas

En los LDCGB se han identificado cambios recurrentes primarios y secundarios que se observan entre el 50% y el 67% de los casos.^{50;173} En la mayoría de los LDCGB hay alteraciones clonales (87%) siendo los cariotipos hiperdiploides (72%) más frecuentes que los cariotipos diploides (25%) o que los hipodiploides (14%).¹⁷⁴⁻¹⁸⁰

4.3.1. Alteraciones primarias

En los LDCGB suelen afectarse tres genes, desregulados bajo el control inapropiado de *IgH*: *BCL6*, *BCL-2* y *C-MYC*.¹⁸¹ El gen que se trasloca con mayor frecuencia es *BCL6*,

localizado en 3q27 (35-40%),¹⁸²⁻¹⁸⁶ que se reordena con más frecuencia con 14q32 (26%)¹⁸⁵ que con otras regiones como 1p32, 1p34, 3p14, 4p11, 6q23, 9p13, 11q23, 12p13, 14q11, 16p13 y 22q11.^{185;187;188} *BCL6* es un factor de transcripción regulador de la proliferación y diferenciación celular. En los LDCGB la expresión constitutiva desregulada de *BCL6* conduce a una parada madurativa y les confiere una ventaja proliferativa.¹⁸⁹

En el 15% de los LDCGB se observa la t(14;18), que generalmente aparece asociada con otras alteraciones. La presencia de esta traslocación se interpreta como una transformación de un LF a LDCGB no detectable en la fase folicular.¹⁹⁰ Aunque la desregulación de *BCL2* esté comúnmente asociada con la t(14;18), su expresión puede ser detectada en la mitad de los LDCGB, independientemente de la t(14;18).^{191;192}

Otro gen desregulado bajo el control inapropiado de la *IgH* es *C-MYC*, factor de transcripción generalmente asociado con los LB, que se puede observar desregulado en el 15% de los LDCGB, por lo general debido a la t(8;14).^{192;193} Los reordenamientos de *C-MYC* no tienen efectos claros en la supervivencia.^{192;193}

Las alteraciones citogenéticas que potencialmente son indicadoras de progresión tumoral en los LDCGB son la del(6), y las trisomías de los cromosomas 7 y 12.^{194;195}

4.3.2. Alteraciones secundarias

Mediante estudios de citogenética convencional se ha comprobado que en los LDCGB todos los cromosomas pueden estar afectados por cambios numéricos. Las alteraciones numéricas más frecuentes son las trisomías de los cromosomas 3 (19%), 7 (18%), 12 (14%), 18 (12%), 5 (7%), 1 (6%) y 11 (3%) así como las monosomías del 17, 13 y X (3%). Las deleciones parciales de los cromosomas no se producen al azar, sino que se concentran en las regiones 1p36, 1p33-p34, 1p31, 1q32, 3p25-p26, 3p21, 3q21, 6q15, 6q21, 6q23-q25 y 7q32.¹⁹⁶

En los LDCGB los estudios de HGC convencional han demostrado la presencia de una gran complejidad genética, con ganancias completas o parciales de los cromosomas 3, 8, 11, 15, 16, y pérdidas en los cromosomas 5, 10, 15, 16, 17, y 20. Se ha observado también la presencia de amplificaciones en 1q21, 3q21-q22, 8q12, 8q24, 9p12-13, 9q34, 11q23.3-24, 13q33-34 y 16p12, pero la región genética que se amplifica con más frecuencia en los LDCGB es 2p13-p15.¹⁹⁷ Estos cambios genéticos conllevan la amplificación de algunos genes como *REL*, *MYC*, *BCL2*, *CDK4*, *MDM2*, y *GLI*.^{198;199} De todos ellos, *REL*, con una incidencia aproximadamente del 25%, fue el gen amplificado más frecuentemente en los LDCGB.¹⁹⁷

Esta inestabilidad genética se ha confirmado mediante estudios de arrays genómicos, que han demostrado la presencia de numerosas regiones con ganancia o pérdida en estos linfomas y además se relacionan con los subtipos de LDCGB determinados por PEG (Tabla 10). Así, las ganancias a nivel de 3q23-q28 se observaron en 25-36% de los casos del grupo LDCGB-ABC mientras que no aparecían en ningún caso del grupo LDCGB-CG. Por el contrario, las ganancias de 7q22-q36 se observaron entre el 50-61% de los casos del grupo LDCGB-CG y en muy pocos del grupo LDCGB-ABC. Estas diferencias proporcionan evidencias de que los grupos ABC y CG son genéticamente distintos.⁹⁵

Tabla 10. Alteraciones cromosómicas significativas (p<0.05) detectadas mediante arrays genómicos para cada uno de los subgrupos de LDCGB.

	LDCGB CG n=18	LDCGB ABC n=28
Ganancias	1q21.1-q23.3 44%	3q23-q28 25-36%
	1q31.1-q42.13 44-50%	18q11.2-q23 46-54%
	2p15-p16.1 33%	19q13.32-q13.33 46%
	7q22.1-q36.2 50-61%	19q13.41-q13.42 54%
	12q13.13-q14.1 44%	
Pérdidas		6q22.1-q24.1 39-46%
		9p21 68%

4.4. Factores pronósticos en los LDCGB

El proyecto internacional de los factores pronósticos de los LNH estableció un predictor clínico de la supervivencia global en los linfomas de grado intermedio donde se incluían a los LDCGB. El índice de pronóstico internacional (IPI) está basado en 5 factores pronóstico independientes: edad, estadio de Ann Arbor, nivel de la lactato deshidrogenasa (LDH), estatus (ECOG), y número de sitios extranodales afectados. La subdivisión de los pacientes de acuerdo con el número de factores pronóstico en: bajo grado (ninguno o un factor), grado bajo-intermedio (dos factores), grado alto-intermedio (tres factores) o grado alto (cuatro o cinco factores) con una supervivencia global a los 5 años de 73%, 51%, 43%, y 26%, respectivamente, motivó su rápida incorporación a la clínica.²⁰⁰ El valor pronóstico del IPI ha sido validado sucesivamente en pacientes con LDCGB.²⁰¹⁻²⁰³

Hasta la fecha se han confirmado pocos marcadores moleculares que estén asociados con la supervivencia. Los estudios de citogenética convencional han identificado que los cambios en los cromosomas 1q, 5, 7q, y 14 se han relacionado con supervivencia inferior mientras que las ganancias de 3p se han asociado con pronóstico incierto.^{178;204-206} Por HGC convencional se ha confirmado una asociación entre las pérdidas en 17p (*TP53*) y menor supervivencia.^{50;173;197;199}

La clasificación de los LDCGB en ABC, CG y tipo 3 tiene valor pronóstico independiente del IPI.^{160;161;200;207;208} Los pacientes con LDCGB-CG tienen una supervivencia clínica más favorable que los que tienen LDCGB-ABC o los del linfoma tipo 3.^{160-162;209}

Con la clasificación de los LDCGB en CG y No-CG mediante la inmunohistoquímica, algunos estudios determinaron que la expresión de CD10 es un factor pronóstico favorable para la supervivencia libre de enfermedad y para la remisión completa.^{164;169;210} Sin embargo, aún no está claro si la expresión de la proteína Bcl-6 tiene alguna relación con el pronóstico de esta neoplasia.^{167;168}

El valor pronóstico de la expresión de la proteína Bcl-2 en los LDCGB ha sido estudiado con amplitud y se ha relacionado con peor pronóstico^{191;211} en los LDCGB-ABC²¹² y en los LDCGB-CG.²¹³ Mediante la suma de la expresión de Bcl-2 a la expresión de las proteínas CD10 y MUM1 relacionadas con CG y ABC, se propuso un nuevo algoritmo para identificar grupos pronóstico en LDCGB.²¹⁴ (Figura 4) Este algoritmo demostró que tenía un poder pronóstico más fuerte que el algoritmo propuesto por Hans et al.^{166;215}

Por tanto, la mayoría de estos estudios se ha centrado en el análisis de las alteraciones genéticas en grupos de enfermos con tratamientos diversos. A pesar del elevado número de enfermos con LDCGB analizados por arrays genómicos, no se dispone de estudios que valoren el impacto pronóstico de las alteraciones genéticas en una serie de enfermos con un tratamiento uniforme.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Los CGH-arrays permiten analizar en un solo experimento, la presencia de ganancias y pérdidas de cualquier segmento del genoma y gracias al aumento de su resolución es posible delimitar las regiones génicas implicadas en los procesos neoplásicos que podrían pasar inadvertidas mediante otras técnicas de citogenética molecular. Además, esta metodología sólo precisa de una pequeña cantidad de ADN de la muestra pudiéndose obtener resultados de calidad con muestras archivadas incluidas en parafina. Esta ventaja es muy importante debido a que, en ocasiones, la cantidad de muestra para la realización de los estudios es escasa.

Los LEZM son un tipo de linfoma no hodkingniano de células B que recientemente se han definido como una entidad diagnóstica independiente y de los que aún no se conocen marcadores genéticos específicos de esta enfermedad. Mediante la aplicación de las técnicas de citogenética molecular (HGC, HISF o LOH) al estudio de estos linfomas se ha podido localizar la región comúnmente perdida a nivel del cromosoma 7, pero son necesarios más estudios con técnicas de mayor resolución para poder precisar y acotar con más detalle la región comúnmente alterada en este cromosoma. La posibilidad de analizar en un solo experimento, mediante CGH-arrays, el genoma de los LEZM podría delimitar la región que se pierde en este tipo de linfomas, así como aportar información relativa a nuevas alteraciones genómicas implicadas en esta enfermedad.

Los arrays genómicos se han utilizado para el estudio de los LDCGB. Sin embargo, al analizar con detalle se puede observar que estos estudios se han centrado en describir las alteraciones genómicas de los pacientes diagnosticados de LDCGB, pero ninguno de ellos se ha realizado sobre un grupo de pacientes tratados homogéneamente por lo que no se han podido correlacionar las alteraciones observadas por los arrays genómicos y la evolución de los enfermos tras el tratamiento.

En el presente trabajo doctoral se han analizado mediante arrays genómicos o CGH-arrays dos tipos de LNH-B. En los LEZM, nuestra hipótesis se ha basado en que un análisis en profundidad de estos linfomas mediante CGH-arrays podría identificar y cartografiar con mayor precisión la región comúnmente delecionada a nivel del cromosoma 7, a la vez que identificar los genes localizados en este cromosoma y que podrían estar implicados en la patogenia de esta enfermedad.

En los LDCGB hemos partido de un grupo de enfermos tratados de manera homogénea. La hipótesis planteada se ha basado en que el uso de los CGH-arrays en esta enfermedad podría identificar nuevos marcadores genéticos que tuvieran relación con la respuesta al tratamiento y el pronóstico en estos enfermos.

Objetivo general:

Profundizar en el conocimiento de las alteraciones genómicas determinadas por arrays genómicos en dos grupos de pacientes diagnosticados de linfoma no Hodgkin de línea B, los linfomas esplénicos de la zona marginal y los linfomas difusos de célula grande B, y de sus relaciones con las características clínicas de los enfermos.

Objetivos específicos:

1. Analizar la utilidad y reproducibilidad de un CGH-array de BACs
2. Estudiar las alteraciones genéticas que se observan en los pacientes diagnosticados de linfoma esplénico de la zona marginal.
3. Delimitar la región comúnmente perdida en el cromosoma 7 mediante el análisis con arrays genómicos, complementado con otras técnicas de análisis genético, en los linfomas esplénicos de la zona marginal.
4. Llevar a cabo un análisis de las ganancias y pérdidas de material genético en los enfermos diagnosticados de linfoma difuso de célula grande B.
5. Analizar la relación que existe entre los cambios en el genoma y los datos clínicos en una serie enfermos con linfoma difuso de célula grande B tratados de manera homogénea.

MATERIAL Y MÉTODOS

I. MATERIAL

Se realizaron estudios de arrays genómicos en un total de 108 enfermos diagnosticados de Linfoma no Hodgkin de línea B y en 20 controles sanos. De los 108 enfermos, 68 estaban diagnosticados de linfoma esplénico de la zona marginal (LEZM) y 40 de linfoma difuso de célula grande B (LDCGB). En un grupo seleccionado de 24 enfermos diagnosticados de LEZM se analizó, mediante arrays de oligonucleótidos, la presencia de ganancias y de pérdida de material genético. Como metodología de confirmación de los datos obtenidos por los arrays genómicos se realizaron estudios de HISF en 49 enfermos.

En todos los casos se obtuvo el consentimiento de los enfermos y los estudios fueron aprobados por el comité ético del Hospital Clínico Universitario de Salamanca.

Las características clínicas y biológicas más relevantes de los enfermos analizados en el presente trabajo se detallan en cada uno de los capítulos.

II. MÉTODOS

1. BAC-Array

La técnica de los BAC-arrays se puede dividir en cuatro bloques bien diferenciados: diseño del BAC-array, preparación del ADN que se hibrida o sonda, hibridación del ADN sobre el BAC-array y adquisición de imágenes. Para facilitar la comprensión de la técnica se seguirá el esquema detallado a continuación. (Figuras 5 y 6)

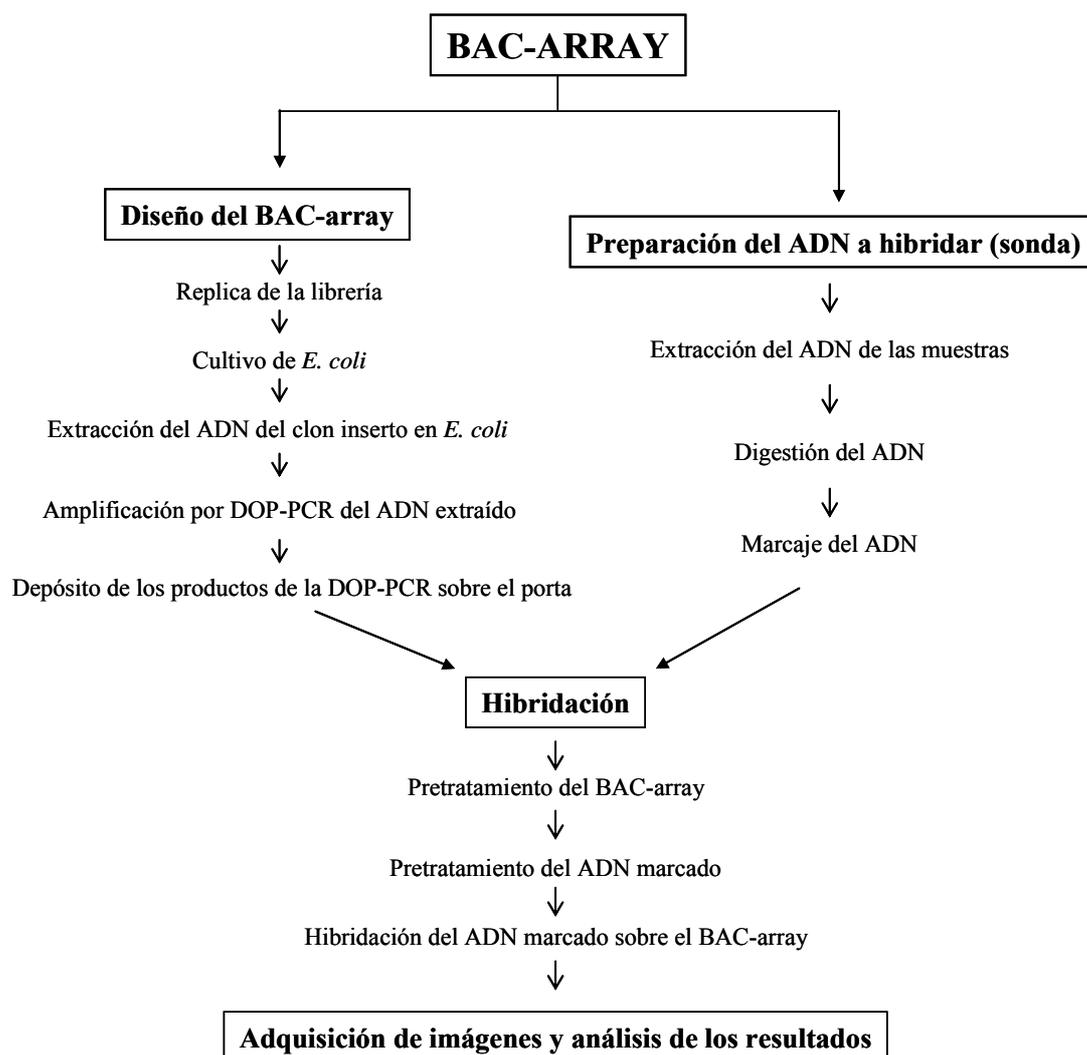


Figura 5. Esquema del desarrollo de la metodología del BAC-array.

1.1. Diseño del BAC-array

El BAC-array sobre el que se realizaron las hibridaciones de las muestras se diseñó a partir de la librería “1Mb clone set” cedida por el Dr Nigel Carter del “Wellcome Trust Sanger Institute” de Cambridge, Inglaterra. La librería constaba de 3.523 clones insertos mediante BAC o PAC (cromosomas artificiales de bacterias y de P-1, respectivamente) con el vector de clonación M13 en *Escherichia coli* y distribuidos en 60 placas de 96 pocillos tal y como se indica en su página web: <http://www.sanger.ac.uk/HGP/methods/mapping/info/lib-details.shtml> (Tabla 11).

Tabla 11. Distribución de los clones en las placas de la librería 1Mb clone set.

Placa	N° Clones	Placa	N° Clones	Placa	N° Clones	Placa	N° Clones
Cáncer 1	81	NONSC 12	88	NONSC 34	9	SC6 1MB BAC1	85
Cáncer 2	36	NONSC 13	94	NONSC 35	91	SC6 1MB PAC	84
Cáncer 3	52	NONSC 14	96	NONSC 36	3	SC9 1MB BAC1	94
Cáncer 4	10	NONSC 15	96	NONSC 37	3	SC9 1MB BAC2	18
NONSC 1	95	NONSC 16	50	NONSC 38	23	SC10 1MB BAC1	91
NONSC 2	72	NONSC 23	2	NONSC 39	14	SC10 1MB BAC2	39
NONSC 3	83	NONSC 24	91	NONSC 40	88	SC10 1MB PAC	4
NONSC 4	96	NONSC 25	15	NONSC 41	96	SC13 1MB BAC1	96
NONSC 5	96	NONSC 27	95	NONSC 42	14	SC13 1MB BAC2	3
NONSC 6	95	NONSC 28	96	NONSC 43	96	SC20 1MB BAC	17
NONSC 7	96	NONSC 29	73	NONSC 44	7	SC20 1MB PAC	48
NONSC 8	96	NONSC 30	2	SC1 1MB BAC1	91	SC22 0.75 BAC	25
NONSC 9	84	NONSC 31	39	SC1 1MB BAC2	45	SC22 0.75 PAC	20
NONSC 10	96	NONSC 32	58	SC1 1MB PAC	83	SCX 1MB BAC1	38
NONSC 11	96	NONSC 33	12	SC6 1MB BAC1	85	SCX 1MB PAC1	66
						TELOMERE	40

De los 3.523 clones, 176 contenían genes relacionados con cáncer (oncogenes o genes supresores de tumores). El resto de los clones están distribuidos a lo largo del genoma humano (Apéndice 1 Anexo II), espaciados a intervalos de aproximadamente 1 Mb. Toda la información acerca de los clones, su localización cromosómica y el contenido en genes de los mismos se pueden obtener en las páginas de internet (www.ensembl.org, www.ucsc.org).

Además de los 3.523 clones, se han incluido como controles negativos internos del BAC-array 5 clones de *Drosophila melanogaster* (23N02, 35P22, 39C21, 45L08 y 47P08; Genoteca CHORI-221), 1 de *Schizosaccharomyces pombe* (cos 1782) y 99 de la solución DMSO al 50% (Dimetil sulfoxido, Merck). Como controles positivos se han usado 12 diluciones seriadas de mezclas de productos de la DOP-PCR. Los controles se distribuyeron aleatoriamente por el portaobjetos.

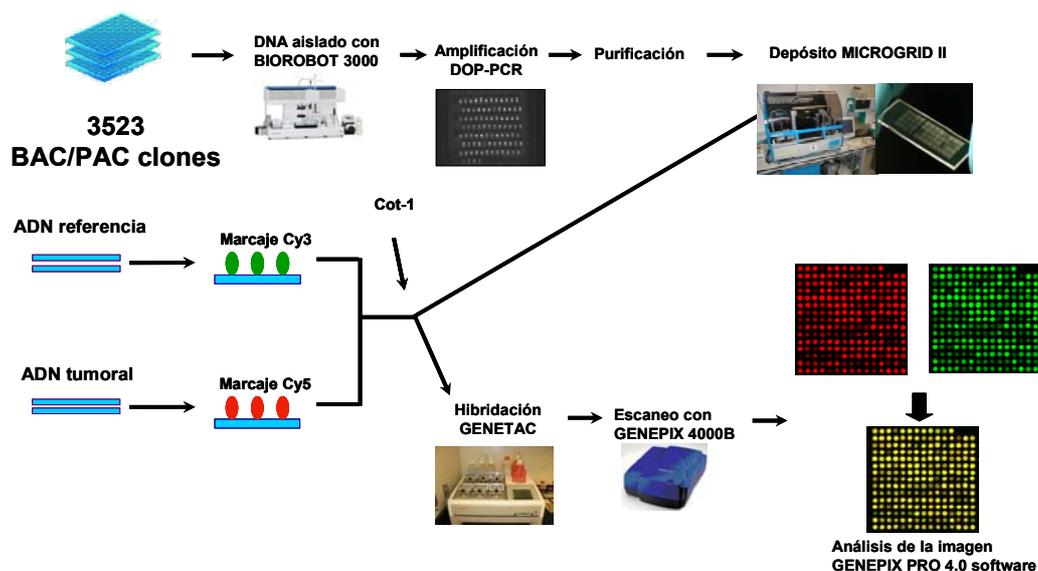


Figura 6. Representación esquemática de la metodología de los BAC-arrays desde el diseño del array hasta el análisis de los resultados.

1.2. Réplica de la librería

Para evitar la contaminación por el fago T-1 que causaría la lisis del cultivo bacteriano de *E. coli* es necesario hacer una réplica en glicerol a -80°C . Esta réplica es la que se manipula en los cultivos sucesivos.

Reactivos y soluciones:

Medio líquido LB (ajustar el pH a 7)

- Peptona 10 gr/l
- Extracto de levadura 5 gr/l
- NaCl 5 gr/l

Glicerol (Merck).

Antibiótico: Cloranfenicol (Sigma) y Kanamicina (Sigma).

Procedimiento:

1. Preparar en una botella estéril, 1,5 ml de medio de cultivo LB por cada clon.
2. Añadir al medio de cultivo el 7,5% de glicerol.
3. Autoclavar la mezcla del medio de cultivo junto con el glicerol.
4. Añadir el antibiótico apropiado, dependiendo del clon que se vaya a crecer (Tabla 12).

5. Repartir 1,5 ml de la mezcla a cada pocillo de la placa de 96 pocillos.
6. Inocular la colonia a crecer en cada pocillo.
7. Incubar en agitación a 275 rpm, a 37°C durante 16 horas.
8. Alicuotar cada clon en un tubo estéril perfectamente identificado.
9. Congelar a - 80°C para la óptima conservación de los clones.

Tabla 12. Antibiótico y concentración adecuada al código del clon de la librería “1Mb clone set”.

Antibiótico	Código de la librería							
	bA	bK	bB	bG	cN	cE	dJ	dA
Cloranfenicol (µg/ml)	25	12,5	25	25				
Kanamicina (µg/ml)					30	30	25	25

1.3. Cultivo de *Escherichia coli*

Para la obtención de una gran cantidad de ADN de los clones, el medio de cultivo 2x YT es el idóneo para el crecimiento de *E. coli*. Se ha escogido esta bacteria por su facilidad de manipulación y su crecimiento exponencial a unas condiciones fáciles de obtener en el laboratorio.

Reactivos y soluciones:

Medio de cultivo 2x YT (ajustar el pH a 7)

- Peptona 16 gr/l
- Extracto de levadura 10 gr/l
- NaCl 5 gr/l

Antibióticos: Cloranfenicol y Kanamicina (Sigma).

Procedimiento:

1. Preparar 2,5 ml de medio 2x YT para cada clon en una botella estéril.
2. Añadir el antibiótico correspondiente dependiendo del código de la librería de cada clon (Tabla 12).
3. Repartir 2,5 ml de medio junto con el antibiótico en cada pocillo de las placas de 48 pocillos.

4. Inocular una colonia bacteriana en cada pocillo de la placa.
5. Incubar la placa a 37°C, a 175 rpm durante 16 horas.
6. Proceder a la extracción del ADN.

1.4. Extracción del ADN del clon

Una vez que se ha obtenido un crecimiento óptimo del cultivo bacteriano de *E. coli*, el siguiente paso a seguir en la preparación del BAC-array fue la extracción del ADN bacteriano junto con el inserto para así, tras su amplificación, poder depositarlo en el portaobjetos sobre el que se va a hibridar. Los métodos de extracción pueden ser manuales o automatizados (Biorobot, QIAgen) (Figura 7).

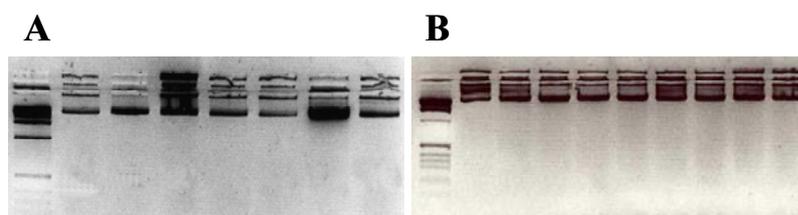


Figura 7. Gel de agarosa con los ADN extraídos de los clones bacterianos. A) Método de extracción manual: en cada carril del gel de agarosa se representa un ADN de un clon. B) Método de extracción automatizado: los nueve carriles de la parte derecha de la imagen corresponden a diferentes ADN extraídos de los BAC donde estaban insertos. En ambas imágenes el primer carril es el marcador de peso molecular (1Kb DNA ladder, Invitrogen).

1.4.1. Extracción manual del ADN inserto en los clones de bacterias

Reactivos y soluciones:

Medio de cultivo 2x YT.

Antibióticos: Cloranfenicol y Kanamicina (Sigma).

Solución de lisis: 1,25 ml Tris 1 M; 1 ml EDTA 0,5 M; 22,5 ml Glucosa al 40% y
22,5 ml H₂O destilada.

SDS alcalino: 0,2 M NaOH y 1% SDS.

Acetato sódico 3 M pH 5,2.

Isopropanol (Merck).

Acetato sódico 3 M pH 7.

Fenol (BDH).

Cloroformo (Merck).

TE 1X pH 8: 10 mM Tris HCl y 1 mM EDTA.

RNAasa [$1\mu\text{g}/\mu\text{l}$] (Sigma).

Etanol al 70% (Merck).

Procedimiento:

1. Añadir en un tubo estéril, 13 ml de medio de cultivo y el antibiótico correspondiente (ver Tabla 12).
2. Inocular una colonia de bacteria en el medio y dejar crecer durante 16 horas a 37°C , en agitación a 250 rpm.
3. Centrifugar los tubos a 3.400 rpm a temperatura ambiente durante 10 minutos. Decantar y escurrir el sedimento.
4. Añadir 200 μl de solución de lisis y resuspender el sedimento. Transferir a un tubo de 1,5 ml y dejar actuar la lisis durante 10 minutos a temperatura ambiente para que se rompan las membranas.
5. Agregar 400 μl de SDS alcalino y mezclar por inversión. Incubar 5 minutos en hielo.
6. Añadir 300 μl de acetato sódico 3 M pH 5,2; mezclar por inversión e incubar en hielo 10 minutos.
7. Centrifugar 5 minutos a 13.000 rpm a temperatura ambiente y pasar el sobrenadante a un tubo limpio.
8. Añadir 600 μl de isopropanol, agitar e incubar 30 minutos a temperatura ambiente.
9. Centrifugar 5 minutos a temperatura ambiente a 13.000 rpm. Decantar y dejar secar el sedimento.
10. Resuspender el sedimento en 200 μl de acetato sódico 0,3 M a pH 7 y dejar en hielo entre 20 y 30 minutos. Volver a resuspender.
11. Añadir 200 μl de fenol/cloroformo, proporción 1:1; mezclar y centrifugar 3 minutos a 13.000 rpm a temperatura ambiente.
12. Pasar la fase acuosa a un tubo estéril.
13. Añadir 200 μl de isopropanol y mezclar por inversión. Incubar 30 minutos a temperatura ambiente.
14. Centrifugar 5 minutos 13.000 rpm. Decantar y secar el sedimento.
15. Agregar 500 μl de etanol 70% a -20°C sin mover el sedimento. Centrifugar 2 minutos a 13.000 rpm. Decantar y secar el sedimento.

16. Añadir 50 µl de TE 1X pH 8 y 1 µl de RNAasa.
17. Resuspender el sedimento. Incubar a 55°C durante 15 minutos para que actúe la RNAasa. Testar en un gel de agarosa al 1% y conservar a 4°C o a - 20°C.

1.4.2. Extracción automatizada del ADN genómico mediante robot (*REALprep*)

La extracción automatizada del ADN se realizó en el Biorobot 3000 (QIAgen, Hilden, Alemania) empleando el *REALprep 96 Biorobot Kit* (QIAgen). La posterior concentración y purificación del ADN extraído se realizó manualmente.

Reactivos y soluciones:

Medio de cultivo 2x YT. Recomendado para el empleo de este Kit.

Antibióticos: Cloranfenicol ó Kanamicima (Sigma).

Kit: *REALprep 96 Biorobot Kit* (QIAgen).

Etanol al 70% (Merck).

10 mM Tris-Cl, pH 8.5.

Procedimiento:

1. Preparar en placa de 48 pocillos, 2,5 ml de medio 2x YT más el antibiótico selectivo apropiado (Tabla 12).
2. Inocular directamente del stock de glicerol, la colonia de bacterias en cada pocillo de las placas.
3. Incubar en agitación, entre 12 y 16 h, a 175 rpm y 37°C.
4. Centrifugar 13 minutos a 3.000 rpm
5. Eliminar el sobrenadante por volteo y seguir el protocolo en el robot.
6. Centrifugar a 13.200 rpm, a temperatura ambiente, durante 30 minutos el producto obtenido del biorobot.
7. Voltar para eliminar el sobrenadante. Añadir 500 µl de etanol al 70% frío.
8. Centrifugar a 13.200 rpm, a temperatura ambiente, durante 15 minutos.
9. Voltar para eliminar el sobrenadante.
10. Mantener a 65°C en un termoblock hasta que los sedimentos estén secos.
11. Resuspender en 30 µl de 10 mM Tris-Cl, pH 8.5 y mantener a 4°C toda la noche.

1.4.3. Comprobación cualitativa de los ADNs extraídos mediante electroforesis en gel de agarosa

Reactivos y soluciones:

Agarosa MS-12 (Pronadisa).

TBE: 0,089 M Tris-borato, 0,089 M ácido bórico, 0,002 M EDTA pH 8,0.

Bromuro de etidio (1 mg/ml) (Sigma).

Tampón de carga: 0,25% azul de bromofenol / 30% glicerol.

Marcador de peso molecular de 1 Kb (Invitrogen).

Procedimiento:

Disolver 0,5 gr de agarosa en 50 ml de TBE 1X con Bromuro de etidio, para hacer un gel al 1%.

1.5. Amplificación del ADN por DOP-PCR

Para cada clon se realizan tres amplificaciones por DOP-PCR (Figura 8). El empleo de los tres cebadores descritos a continuación hace posible la amplificación del ADN humano de manera eficaz y además reduce considerablemente la posible contaminación por ADN de *E. coli*.²¹⁶

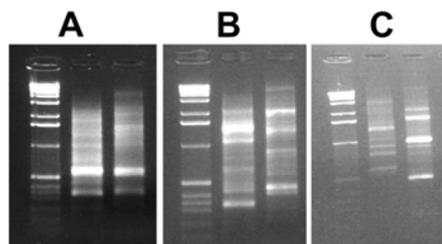


Figura 8. Imagen del producto de la DOP-PCR en un gel de agarosa. A) El primer carril es el marcador de peso molecular, el segundo y el tercero son productos procedentes de la amplificación del ADN de dos BAC con el cebador DOP 1; B) El primer carril pertenece al marcador de peso molecular y el resto son productos obtenidos de la amplificación de esos ADN de los BAC con el cebador DOP 2; C) Al igual que las imágenes anteriores el primer carril es el marcador de peso molecular y los dos siguientes son los productos de la amplificación de los mismos ADN con el cebador DOP 3. En la imagen puede apreciarse que el patrón de bandas obtenido con cada cebador es diferente.

Reactivos y soluciones:

- TAPs solución salina (TAPs S.S.) (250 mM):
- 0,608 gr de TAPs (“N-tris[Hydroxymethyl]methyl-3-aminopropane-sulfonic acid” Mínimo 99,5%, Sigma).
- 9,3 ml de H₂O miliQ.
- 0,220 gr Sulfato amónico (166 mM) ((NH₄)₂SO₄, Mínimo 99%, Sigma).
- 250 µl Cl₂Mg (25 mM) 1 M.

El volumen final será de 9,6 ml. Ajustar el pH a 9.3 con KOH.

Mantener la solución de TAPs S.S. al ultravioleta durante 30 minutos.

Alicuotar 960 µl de la TAPs S.S. en cada tubo estéril y guardar las alícuotas a -20°C.

Cada vez que se utilice el TAPs S.S es necesario añadir:

- 31,68 µl de BSA 5% (33 µl/ml).
- 6,72 µl de β-mercaptoetanol (7 µl/ml).
- dNTPs:
 - 2,5 µl de cada nucleótido: ATP, CTP, GTP y TTP [25 mM], (Roche).
 - 90 µl de H₂O milliQ.
- W-1 al 1% (Polioxietilen eter, Sigma).
- Cebadores (Thermo, Electron Corporation), purificados mediante HPLC y en donde N puede ser cualquiera de los cuatro ácidos nucleicos (A, T, C, G).

DOP 1: Secuencia	5'-CCG ACT CGA GNN NNN NCT AGA A-3'
DOP 2: Secuencia	5'-CCG ACT CGA GNN NNN NTA GGA G-3'
DOP 3: Secuencia	5'-CCG ACT CGA GNN NNN NTT CTA G-3'

- Taq-Polimerasa [5 U/µl], (Promega).

• Programa de la reacción de la DOP-PCR:

94°C 3'	} x 10 ciclos.
94°C 1'30"	
30°C 2'30"	
Rampa de 0,1°C/segundos hasta 72°C	
72°C 3'	
94°C 1'] x 30 ciclos.
60°C 1'30"	
72°C 2'	
72°C 8'	
12°C ∞	

Hay que tener en cuenta que para el cebador DOP 2 la temperatura óptima de anillamiento es de 62°C en lugar de 60°C, que es necesaria para el DOP 1 y el DOP3.

Procedimiento:

1. Alicuotar 5 µl del ADN de los clones extraídos anteriormente en las placas de 96 pocillos. Como hay 3 cebadores se preparan tres placas.

2. Preparar la mezcla de reacción de PCR:

Para cada reacción de PCR se prepara la siguiente mezcla:

- TAPs	5,5 µl
- dNTPs	4,4 µl
- W-1	2,7 µl
- Cebador (20 µM)	1,5 µl
- Taq-polimerasa	2 U
- H ₂ O	hasta 52 µl

3. Añadir a cada pocillo de las placas con los ADN previamente alicuotados, 52 µl de la mezcla de reacción de la PCR.

4. Agitar para que el ADN se mezcle bien con los demás componentes de la reacción de PCR y centrifugar unos segundos.

5. Correr el programa en el termociclador.

6. Una vez finalizado mantener a 4°C. Testar en gel de agarosa al 1%.

7. Guardar los productos de DOP-PCR a – 20°C hasta que se precipiten. La concentración final de los productos de PCR es aproximadamente 200 ng/µl.

1.6. Precipitación de los productos de DOP-PCR

La precipitación de los productos de DOP-PCR se realiza para eliminar todos los reactivos sobrantes de la reacción de DOP-PCR dejando únicamente los productos amplificados (Figura 9).

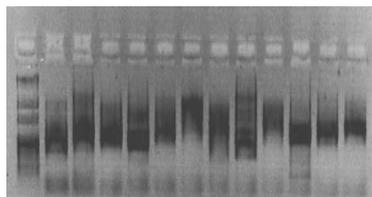


Figura 9. Imagen del gel de agarosa cargado con los productos de las DOP-PCR precipitados.

El primer pocillo es el marcador de peso molecular y en los restantes pocillos se muestra el producto resultante de la precipitación y posterior resuspensión en DMSO 50% del ADN amplificado mediante los tres cebadores, DOP1, DOP2 y DOP3.

Reactivos y soluciones:

Acetato Sódico 3 M pH 5,2.

Etanol absoluto y etanol al 70% (Merck).

DMSO al 50% (Dimetil sulfoxido, Merck).

Procedimiento:

1. Añadir el 10% de acetato sódico 3 M pH 5,2 y 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío a cada pocillo de la placa de 96. Invertir varias veces. Mantener a -80°C durante 30 minutos.
2. Centrifugar a 4°C y a 3.700 rpm durante 60 minutos.
3. Voltar para eliminar el sobrenadante. Añadir 150 μl de etanol al 70% frío para lavar los sedimentos y mezclar por volteo.
4. Centrifugar a 3.700 rpm, a 4°C durante 30 minutos.
5. Voltar para eliminar el sobrenadante.
6. Mantener a 65°C en una estufa hasta que los sedimentos estén completamente secos.
7. Resuspender en 13,4 μl de DMSO al 50%. Mantener a 4°C toda la noche.
8. Testar los productos de DOP-PCR en gel de agarosa al 1%.
9. Mezclar los productos de las 3 DOP-PCR precipitados. Centrifugar durante unos segundos. Trasvasar a placas de 384 y guardar a -20°C .

1.7. Depósito de los ADN de los BACs sobre un soporte sólido de vidrio con recubrimiento de amino-silano “Ultragaps Coated Slides”

En general, el proceso del depósito de los ADN en los portas consiste en su colocación ordenada en un portaobjetos, previamente tratado, para que se una a su superficie. A los

productos de DOP-PCR que quedan unidos en el soporte de cristal les llamaremos dianas o clones.

Una vez que tenemos las placas de 384 con los productos de DOP-PCR, resuspendidos en DMSO al 50%, se procede al depósito robotizado y por triplicado de estos clones sobre los portaobjetos.

1.7.1. Escaneado de los portaobjetos prehibridados para la comprobación del estado del chip

Para comprobar que el proceso de depósito ha sido correcto, los portaobjetos se escanean usando el “*scanner GenePix 4000 B*” (Axon Instruments, Burlingame, California) (Figura 10).

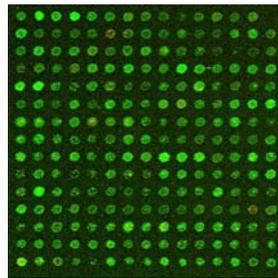


Figura 10. Imagen del BAC-array antes de hibridar. Todos los puntos del chip están correctamente depositados y la concentración del producto de DOP-PCR es la idónea para la hibridación. En el microarray hay un total de 10.884 puntos que corresponden al total de los productos depositados en el mismo (3.523 clones más los controles internos positivos y negativos, todos por triplicado) distribuidos en 12 x 4 cuadrantes. Cada cuadrante contiene 15 x 15 puntos.

1.8. Preparación del ADN para la hibridación (sonda)

El siguiente bloque en el proceso de los arrays genómicos es la preparación de la sonda que posteriormente se hibridará sobre el array (Figura 5).

1.8.1. Extracción y purificación del ADN

Para la realización de las hibridaciones sobre los arrays genómicos disponíamos de diferentes tipos de muestras a partir de las cuales se podía extraer el ADN.

La extracción de ADN a partir de células disgregadas del tejido fresco, o bien de células congeladas en DMSO, tanto de las muestras tumorales como de las usadas como referencia, se basó en la digestión celular con proteinasa K seguido de su extracción con fenol/cloroformo o con *DNA-ZOL*® (M. R. C.) y sin embargo, para la extracción del ADN a partir de muestras que están incluidas en bloques de parafina se empleó el kit comercial *QIAamp*® *DNA Mini Kit* (QIAGEN).

1.8.1.1. Extracción de ADN con fenol/cloroformo

Reactivos y soluciones:

RPMI (Gibco) o PBS.

Proteinasa K: disolver 20 mg/ml de Proteinasa K en 10 mM Tris-HCl, pH 7,5.

Tampón de digestión: 1 M Tris-HCl, EDTA y Tween-20.

Fenol (BDH).

Cloroformo/alcohol isoamílico (24/1) (Merck).

Etanol absoluto y etanol al 70% (Merck).

Procedimiento:

1. Descongelar el tejido disgregado en un baño a 37°C durante 2 minutos.
2. Lavar el tejido con RPMI o PBS y centrifugar a 1.500 rpm durante 5 minutos a 4°C.

Digestión:

3. Resuspender el botón celular en el tampón de digestión y añadir proteinasa K a una concentración final de 50 µg/ml. Mezclar bien e incubar entre 6 y 14 horas en un baño a 55°C.
4. Extracción del ADN con fenol/cloroformo:
5. Añadir a la mezcla de la digestión la mitad del volumen total de fenol y de cloroformo/alcohol isoamílico.
6. Centrifugar a 2.000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente.
7. Recoger la fase acuosa, donde está el ADN, y transferir a un tubo limpio.
8. Añadir el mismo volumen que tenemos de cloroformo/alcohol isoamílico y mezclar bien.
9. Centrifugar 10 minutos a 1.800 rpm a temperatura ambiente.
10. Recoger el sobrenadante en un tubo cónico.

11. Precipitar el sobrenadante recogido con 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío (-20°C), mezclar bien y conservar a -20°C durante, al menos, 30 minutos.
12. Centrifugar a 4°C durante 15 minutos a 12.000 rpm.
13. Lavar el sedimento con etanol al 70% y centrifugar a 12.000 rpm durante 5 minutos.
14. Secar el sedimento a temperatura ambiente.
15. Resuspender el sedimento en H_2O destilada dependiendo del tamaño del mismo.
16. Determinar la concentración y la pureza del ADN mediante la medición de la absorbancia a 260 y 280 nm (A_{260} y A_{280}) en un espectrofotómetro. Aplicar la siguiente fórmula:
 - Concentración de ADN (mg/ml) = A_{260} x factor de dilución x 0,05
17. Almacenar las muestras a -20°C para evitar la degradación del ADN y la posible contaminación por microorganismos.

La pureza del ADN viene determinada por el cociente A_{260}/A_{280} : un valor entre 1,6 y 2,0 representa ADN limpio, si es inferior a 1,6 indica contaminación por proteínas y si es superior a 2,0 significa contaminación por ARN.

1.8.1.2. Extracción del ADN con *DNA-ZOL*® (M. R. C.)

Reactivos y soluciones:

DNA-ZOL® (M. R. C.).

Etanol absoluto y etanol al 75% (Merck).

PBS.

Procedimiento:

1. Descongelar el tejido disgregado en un baño a 37°C durante 2 minutos.
2. Centrifugar 5 minutos a 2.000 rpm y eliminar el sobrenadante.
3. Añadir 500 μl de PBS para lavar las células y centrifugar 5 minutos a 2.000 rpm.
4. Retirar el sobrenadante y añadir 500 μl de PBS para lavar.
5. Centrifugar 5 minutos a 2.000 rpm y eliminar el sobrenadante.
6. Añadir al sedimento 1 ml de *DNA-ZOL*.
7. Homogeneizar con una jeringuilla y dejar reposar durante 15 minutos.
8. Centrifugar 10 minutos a 10.000 rpm.
9. Trasvasar el sobrenadante (donde está el ADN) a un tubo cónico de 2 ml.

10. Añadir 500 µl de etanol al 100% frío (-20°C). Agitar y dejar reposar de 1 a 3 minutos.
11. Centrifugar 5 minutos a 12.000 rpm y decantar.
12. Añadir 500 µl de etanol al 75% a temperatura ambiente, centrifugar 5 minutos a 12.000 rpm y decantar (repetir este proceso dos veces).
13. Dejar secar a temperatura ambiente y añadir H₂O destilada según el sedimento.
14. Testar en un gel de agarosa al 1,6% y medir la concentración en el espectrofotómetro. Almacenar a 4°C.

1.8.1.3. Extracción del ADN de bloques de Parafina con *QIAamp*® DNA Mini Kit (QIAGEN)

Para la obtención del ADN de las muestras de ganglio tanto de los enfermos con LDCGB como de los controles que estaban incluidas en bloques de parafina es necesario realizar una desparafinización previa al empleo del kit *QIAamp*® DNA Mini Kit (QIAGEN), con el fin de asegurar que la parafina no interfiera en la calidad del ADN obtenido.

Reactivos y soluciones:

El kit está compuesto por columnas de purificación, tubos colectores, soluciones de lavado 1 y 2, solución ATL, solución AL y proteinasa K.

Etanol absoluto (Merck).

Xilol (Merck).

Procedimiento:

1. Realizar 20 cortes de 5 a 10 µm del bloque de parafina y recogerlos en tubos cónicos de 15 ml.

Desparafinización de los cortes del bloque:

2. Añadir 10 ml de xilol. Agitar suavemente durante 10 minutos. Centrifugar a temperatura ambiente a 2.500 rpm durante 5 minutos y decantar para eliminar el sobrenadante. Repetir este proceso dos veces.
3. Añadir 10 ml de etanol absoluto. Agitar suavemente durante 10 minutos. Centrifugar a temperatura ambiente a 2.500 rpm durante 5 minutos. Decantar para eliminar el sobrenadante. Repetir dos veces más.
4. Decantar el sobrenadante. Secar totalmente el sedimento.

Extracción del ADN:

5. Añadir 20 μl de proteinasa K y 180 μl de la solución de digestión ATL.
6. Incubar en un baño a 56°C durante toda la noche para que la proteinasa K digiera todo el tejido. Si se ha obtenido una buena digestión, continuar con la extracción, si no se debe dejar más tiempo a 56°C.
7. Añadir 200 μl de solución AL al tubo cónico. Remover por agitación durante 15 segundos. Incubar durante 10 minutos a 70°C.
8. Agregar 200 μl de etanol absoluto. Agitar durante 15 segundos. Añadir 500 μl de solución de lavado 1 y pasar a las columnas de purificación.
9. Centrifugar durante 1 minuto a 11.000 rpm.
10. Descargar el contenido del tubo colector. Añadir 500 μl de solución de lavado 2.
11. Centrifugar durante 3 minutos a 11.000 rpm. Repetir el proceso de centrifugación si la columna no ha quedado suficientemente seca.
12. Colocar la columna en un tubo estéril y añadir 100 μl de agua estéril.
13. Dejar hidratando la columna durante 1 minuto a temperatura ambiente.
14. Centrifugar durante 1 minuto a 11.000 rpm para obtener el ADN.
15. Testar en un gel de agarosa al 1,6% y medir la concentración en el espectrofotómetro. Almacenar a -20°C. (Figura 11).

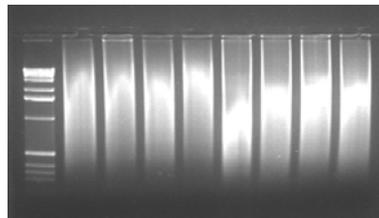


Figura 11. Imagen del gel de agarosa de los ADN procedentes de tejidos incluidos en bloques de parafina. En la figura se representan el marcador de peso molecular (carril de la izquierda) y los diferentes ADN extraídos a partir de los bloques de parafina (parte derecha de la figura).

1.8.2. Digestión del ADN o sonda

Para el correcto marcaje del ADN, tanto de la muestra problema como de la usada como referencia que se van a co-hibridar, es necesario su digestión previa para evitar la circularización y la formación de bucles de la doble cadena del ADN que impediría la incorporación de los nucleótidos fluorescentes. La digestión la lleva a cabo la enzima de

restricción endonucleasa *DpnII*. Mediante esta digestión se obtiene el tamaño idóneo (fragmentos entre 800 - 50 pares de bases) del ADN para que los nucleótidos fluorescentes se unan en el posterior proceso de marcaje.

Reactivos y soluciones:

- Enzima *DpnII* [10.000 U/ml] (*Biolabs*).
- Solución de digestión *DpnII* (*Biolabs*).

Procedimiento:

1. Añadir a un tubo estéril: 2 µg del ADN, 3 µl de solución de digestión *DpnII*, 1,2 µl de enzima *DpnII* y H₂O destilada hasta alcanzar un volumen final de reacción de 35 µl.
2. Incubar 2 horas a 37°C.
3. Inactivar la enzima 20 minutos a 65°C.

1.8.3. Purificación de la sonda digerida

Mediante este proceso se eliminan todos los restos de la enzima *DpnII* y del tampón de digestión que pudieran quedar después de la reacción de digestión para que no interfiera en el marcaje de la sonda.

Reactivos y soluciones:

Fenol (BDH).

Cloroformo (Merck).

TE 1X pH 8.

Acetato sódico 3 M, pH 5,2.

Etanol absoluto y etanol al 70% (Merck).

Procedimiento:

1. Añadir a la sonda ya digerida:
 - 140 µl TE 1X pH 8
 - 175 µl de fenol/cloroformo (proporción 1:1)
2. Mezclar bien mediante agitación durante unos segundos.
3. Centrifugar 5 minutos a 11.000 rpm.
4. Pasar el sobrenadante a un tubo estéril y añadir:
 - 17,5 µl de acetato sódico 3 M, pH 5,2.

- 440 µl de etanol absoluto frío.
- 5. Incubar 30 minutos a - 80°C.
- 6. Centrifugar 20 minutos a 4°C a 13.200 rpm.
- 7. Retirar el sobrenadante. Añadir 500 µl de etanol 70% a -20°C.
- 8. Centrifugar 5 minutos a 4°C a 13.200 rpm.
- 9. Eliminar el sobrenadante con pipeta. Dejar secar el sedimento, resuspender en 41 µl de H₂O destilada y testar en un gel de agarosa al 1%.

1.8.4. Marcaje de la sonda

El proceso del marcaje se realiza mediante el empleo del kit *Bio Prime DNA Labeling System*[®] (Invitrogen). Al ADN desnaturalizado se le unen los *Random Primers*. Estos cebadores se unen aleatoriamente al ADN y van extendiendo la hebra en una reacción de polimerización empleando elevadas concentraciones de la enzima *Exo-klenow* polimerasa I, nucleótidos sin fluorescencia y nucleótidos marcados con fluorescencia. El producto resultante tiene una elevada incorporación de nucleótidos fluorescentes y una amplificación de 7 a 10 veces más del material de partida. La enzima *Exo-Klenow* polimerasa I va realizando cortes en la hebra previamente desnaturalizada del ADN mediante su actividad exonucleasa 3' - 5'. Además, esta enzima posee actividad endonucleasa 5' - 3' para sintetizar junto con los cebadores y la mezcla de nucleótidos una nueva hebra de ADN a la que se van incorporando de forma aleatoria los fluorocromos (Cy3 y Cy5). La muestra tumoral se marca con el fluorocromo Cy5 y la muestra de referencia con Cy3.

Reactivos y soluciones:

El Kit *Bio Prime DNA Labeling System*[®], (Invitrogen) se compone de:

- 2,5x *Random Primers* (cebadores oligodesoxirribonucleótidos)
- 10x *dCTP mix* (1,2 mM dATP, dGTP, dTTP y 0,6 mM dCTP)
- *Exo-Klenow* [40 U/µl]
- *Buffer Stop* (0,5 M EDTA pH 8)

Cy3-dCTP (Cianina3-dCTP) (CyDyeTM 3-dCTP. Amersham Biosciences).

Cy5-dCTP (Cianina5-dCTP) (CyDyeTM 5-dCTP. Amersham Biosciences).

Procedimiento:

1. Añadir al ADN digerido y purificado, 23,5 µl de *Random Primer*. Incubar 5 minutos a 95°C.
2. Pasar al hielo y añadir:
 - 6 µl de la mezcla de nucleótidos 10x dCTP.
 - 3,5 µl de los nucleótidos fluorescentes, Cy3-dCTP o Cy5-dCTP, para el control y para la muestra, respectivamente.
 - 1,2 µl de la enzima *Exo-Klenow*.
3. Mezclar bien y centrifugar unos segundos. Incubar 2 horas a 37°C.
4. Parar la reacción con 6 µl de *Buffer Stop* y mantener los tubos en hielo.

1.8.5. Purificación de la sonda marcada

Mediante este proceso se eliminan los nucleótidos fluorescentes que no se hayan incorporado, así como el resto de los componentes de la reacción que no se han utilizado durante el transcurso de la misma.

Reactivos y soluciones:

TE 1X pH 8

Kit de purificación por columnas *Bio Prime Array CGH Purification Module* (Invitrogen): solución A, solución B, columnas y tubos colectores.

Procedimiento:

1. Añadir a la sonda marcada:
 - 67 µl de TE 1X pH 8.
 - 400 µl de solución A.
2. Mezclar bien, pasar a las columnas y centrifugar 1 minuto a 10.900 rpm a temperatura ambiente.
3. Descargar el filtrado. Añadir 600 µl de la solución B a la columna. Centrifugar 1 minuto a temperatura ambiente a 10.900 rpm.
4. Descargar y añadir 200 µl de la solución B. Centrifugar 1 minuto a temperatura ambiente 10.900 rpm.
5. Descargar el contenido de la columna, ponerla sobre un tubo y agregarle 75 µl de H₂O destilada. Incubar 1 minuto a temperatura ambiente.

6. Centrifugar 1 minuto a 10.900 rpm y desechar la columna.
7. Testar en un gel de agarosa al 1%. Guardar la sonda en oscuridad, para que no se pierda la fluorescencia, a -20°C .

1.8.6. Medida de la incorporación de nucleótidos

Antes de preparar la mezcla de hibridación hay que calcular la cantidad de ADN obtenido y la eficiencia de la reacción de marcaje, para ello se mide la absorbancia de la sonda, en el espectrofotómetro, a las longitudes de onda de 260 nm, 320 nm, 550 nm, 650 nm y 750 nm (Tabla 13).

Tabla 13. Longitudes de onda (λ) medidas mediante el espectrofotómetro de los fluorocromos (Cy3 y Cy5) empleados en el marcaje del ADN.

	Fluorocromo	
	Cy3	Cy5
Línea basal	650 nm	750 nm
Absorbancia	550 nm	650 nm
Excitación	550 nm	650 nm
Emisión	570 nm	670 nm

1°. Cantidad de ADN en μg :

$$(A_{260} - A_{320}) \times 50 \times \text{Volumen sonda (ml)} = \mu\text{g de ADN}$$

Este valor tiene que ser mayor de 2,8 μg .

2°. Cantidad de nucleótido marcado incorporado:

$$[\text{Cy3}]_{\text{pmoles}} = (A_{550} - A_{650}) / 0,15 \times \text{volumen de sonda } (\mu\text{l})$$

$$[\text{Cy5}]_{\text{pmoles}} = (A_{650} - A_{750}) / 0,25 \times \text{volumen de sonda } (\mu\text{l})$$

El total tiene que ser mayor de 100 pmoles.

3°. Ratios: base / fluorocromo:

$$\text{Cy3} = (A_{260} \times 150.000) / (A_{550} \times 6.600)$$

$$\text{Cy5} = (A_{260} \times 250.000) / (A_{650} \times 6.600)$$

Estos valores deben estar entre 40 y 80.

Si los valores obtenidos no se ajustan a los rangos indicados, es conveniente repetir el proceso del marcaje del ADN, ya que sin una óptima incorporación de los nucleótidos fluorescentes al ADN la hibridación no se producirá de forma correcta.

1.9. Hibridación de las sondas sobre el BAC-array

El último paso es la hibridación competitiva junto con ADN Cot-1 humano de los ADNs marcados con los fluorocromos sobre el BAC-array. Ambos componentes de la hibridación necesitan del pretratamiento para que la hibridación se efectúe de forma adecuada.

1.9.1. Pretratamiento de la sonda

Una vez que se han marcado los ADN, tanto del control como de la muestra, y se ha comprobado la correcta incorporación de los nucleótidos fluorescentes, se realiza la fase de pretratamiento de ambos ADN.

Reactivos y soluciones

ADN Cot-1 humano [1µg/1µl]: *Cot Human DNA* (Roche).

Acetato sódico 3 M, pH 5,2.

Etanol absoluto y etanol al 80% (Merck).

Yeast-tRNA [50 mg] (Invitrogen).

Solución de hibridación:

- 50% de formamida (Merck).
- 10% dextransulfato (Amersham Pharmacia Biotech AB).
- 2X SSC (20X SSC: 175,2 gr NaCl, 88,2 gr ácido cítrico dihidratado: pH 7).
- 10 mM Tris pH 7,6.
- 2,7% SDS.
- H₂O destilada hasta completar un volumen de 100 ml.

Procedimiento:

Para realizar la mezcla de hibridación es necesario ajustar la cantidad de nucleótido fluorescente incorporado medido en picomoles obtenido para cada fluorocromo, de tal forma

que se mezclen la misma cantidad de picomoles de cada sonda marcada con 100 µg de ADN Cot-1 humano:

1. Mezclar:

Tumor Cy5: µl según los picomoles.

Control Cy3: µl según los picomoles.

ADN Cot-1 humano: 100 µl de [1µg/1µl].

2. Añadir el 10% del volumen total de la mezcla anterior, de acetato sódico 3 M, pH 5,2. Añadir 2,5 volúmenes de etanol 100% (- 20°C). Mezclar y centrifugar unos segundos.

3. Incubar 30 minutos a - 80°C.

4. Centrifugar 15 minutos a 13.200 rpm a 4°C.

5. Decantar y añadir 500 µl de etanol al 80% frío (- 20°C).

6. Centrifugar 5 minutos a 13.200 rpm a 4°C.

7. Decantar y dejar secar totalmente el sedimento.

8. Añadir:

- 4,5 µl de *Yeast-tRNA* (100 µg/µl).

- 140 µl de solución de hibridación, previamente caliente a 70°C.

9. Resuspender totalmente la sonda en la solución de hibridación. Desnaturalizar 2 minutos a 70°C y preanillar 2 horas a 37°C agitando cada hora.

10. Centrifugar 5 minutos a 13.200 rpm.

Es necesario que la concentración del ADN Cot-1 humano que se añade a la mezcla de hibridación sea de 1 µg/µl.²¹⁷ Por este motivo el ADN Cot-1 humano debe precipitarse previamente y calcular la concentración obtenida para añadir exactamente la cantidad necesaria.

1.9.2. Pretratamiento del BAC-array

Reactivos y soluciones:

Formamida (Merck).

20X SSC.

SDS 10%.

BSA (Albúmina de suero bovino 99%) (Sigma).

H₂O destilada.

0,1X SSC.

Solución de pretratamiento del BAC-array (ajustar el pH a 7)

- 25 ml de 20X SSC.
- 25 ml de formamida.
- 1 ml de SDS al 10%.
- 250 µl de BSA (50 mg/ml).
- 49 ml de H₂O.

Procedimiento:

1. Incubar el BAC-array en la solución de pretratamiento a 42°C, en agitación durante al menos 60 minutos.
2. Realizar un lavado de 5 minutos en 0,1X SSC en agitación a temperatura ambiente.
3. Hacer dos lavados de 1 minuto en H₂O destilada en agitación y a temperatura ambiente.
4. Centrifugar el BAC-array a 2.500 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente.

1.9.3. Hibridación

La hibridación del BAC-array junto con la sonda, se realizó en la estación de hibridación automatizada GENETAC (Genomic Solutions, Ann Arbor, Michigan, EEUU) o en la estación de hibridación HS 4800 Pro (Tecan, Salzburg, Austria). Los portaobjetos se hibridaron con 120 µl de la mezcla de hibridación, previamente preparada, durante 43 horas a 42°C.

1.9.4. Lavados post-hibridación

Del mismo modo que la hibridación, los lavados post-hibridación se realizaron en la estación de hibridación GENETAC o en la estación de hibridación HS 4800 Pro.

Reactivos y soluciones en la estación de hibridación GENETAC:

Formamida (Merck).

20X SSC.

Tween-20 (Sigma).

PBS.

H₂O miliQ.

Procedimiento:

Se prepararon 100 ml de cada una de las soluciones de lavado que deben ser filtradas a vacío para su uso en la estación de hibridación.

Solución I (ajustar el pH a 7)

- 50 ml formamida
- 10 ml de 20X SSC
- 40 ml de H₂O_d
- 100 µl de Tween-20

Solución II

- 100 ml de PBS.
- 50 µl de Tween-20.

Con la solución I se realizaron 3 lavados a 45°C durante 3 minutos y con la solución II un lavado durante 2 minutos a temperatura ambiente, posteriormente el BAC-array se secó a vacío.

Reactivos y soluciones para la hibridación en la estación de hibridación HS 4800 Pro.

Formamida (Merck).

20X SSC.

Tween-20 (Sigma).

SDS.

H₂O miliQ.

Procedimiento:

Se prepararon 600 ml de cada una de las soluciones de lavado que deben ser filtradas a vacío para su uso en la estación de hibridación.

Solución I (ajustar el pH a 7)

- 300 ml formamida
- 300 ml de 2X SSC
- 500 µl de Tween-20

Solución II (ajustar el pH a 7)

- 300 ml formamida
- 300 ml de 2X SSC

Solución III

- 600 ml de 20X SSC
- 40 µl de SDS 0.1%

Solución IV

- 600 ml de 0.1X SSC.

Con la solución I se realizó un lavado a 37°C durante 30 segundos, con la solución II dos lavados durante 1 minuto y 15 segundos a 47°C, con la solución 3 cuatro lavados de 1 minuto y 30 segundos a 47°C y con la solución 4 un lavado de 30 segundos. Finalmente el BAC-array se secó a vacío.

1.9.5. Adquisición de las imágenes

Una vez finalizado el proceso de hibridación, el BAC-array se escaneó simultáneamente a 532 y 635 nm, longitudes de onda para el Cy3 y Cy5 respectivamente, usando el escáner GenePix 4000 B (Axon Instruments, Burlingame, California, EEUU).

2. ARRAYS DE OLIGONUCLEOTIDOS: NimbleGen

En este trabajo doctoral, además del BAC-array, se han empleado tres tipos de arrays de oligonucleótidos de la casa comercial NimbleGen (Roche). Los tres arrays tienen los formatos descritos en la Tabla 14.

Tabla 14. Principales características de los arrays de NimbleGen

Tipo de array	4x72	12x135	Tiling array 1x385 Chr7
Cantidad de ADN	1µg	1µg	1µg
Nº de oligonucleotidos	72.000	135.000	385.000
Nº muestras por array / nº de subarrays	4/4	12/12	1/1
Tamaño de oligonucleotido	25	25	25
Resolución	42 Kb	21 Kb	1-500 pb
Mapea	Todo el genoma	Todo el genoma	Específico del cromosoma 7
Cantidad de ADN marcado	10µg	20µg	10µg
Tiempo de hibridación	24 horas	48 horas	24 horas

La hibridación de los ADNs sobre los arrays de oligonucleótidos se describe brevemente a continuación. La extracción del ADN de los diferentes tipos de muestras se ha detallado en el apartado 1.8 (páginas 51-55). Para este tipo de arrays se necesitan entre 500 y 1.000 ng de ADN tanto de la muestra problema como del control. A diferencia de los BAC-arrays en los que la muestra control se marca con el fluorocromo Cy3, en los arrays de oligonucleótidos es la muestra tumoral la que se marca con este fluorocromo, mientras que los ADN que se utilizan como controles se marcan con el Cy5. Los ADN junto con el fluorocromo se desnaturalizan a elevadas temperaturas (95°C) para su posterior marcaje por *random primer* con los nucleótidos sin fluorescencia y la enzima *klenow* durante 2 horas a 37°C protegidos de la luz. Posteriormente se interrumpe el marcaje con EDTA y se precipita el ADN marcado con NaCl e isopropanol eliminando así todos los componentes de la reacción anterior. El ADN marcado y purificado se hidrata en 25 µl de H₂O y se mide la concentración de ADN obtenida en el NanoDrop. La cantidad de ADN que se hibrida en cada tipo de array depende principalmente del número de oligonucleótidos que se hayan incluido en el array. (Tabla 14)

Ambos ADNs, tanto el control como el tumoral se mezclan en cantidades equimoleculares, se precipitan conjuntamente y se preparan para su hibridación junto al array. Para los formatos de 4 y de 12 subarrays es necesario la incorporación de un identificador que permita el reconocimiento de cada muestra con el array. Estos identificadores se llaman STC (Sample Tracking Buffer) y son específicos para cada subarray lo que facilita la identificación de un STC con su muestra y con una localización dentro del array.

Una vez que está preparada la mezcla de hibridación el siguiente paso es su hibridación sobre el array a 42°C en la estación de hibridación (NimbleGen) durante 16-20 horas para los arrays de 4x72K y de 1x385K y durante 40-72 horas para el formato de 12x135K. Transcurrido este periodo de tiempo se procede a los lavados del array con las diferentes disoluciones de lavado y su escaneado a las longitudes de onda de 532nm y 635nm en el escáner de alta densidad (NimbleGen). La imagen generada con el escáner se analiza mediante el programa NimbleGen Scan versión 2.5. Mediante este programa se separan los diferentes subarrays y a cada uno de manera independiente se le coloca automáticamente una malla que identifica cada oligonucleotido del subarray. Además, para cada uno de ellos se calcula un valor de intensidad de los fluorocromos que posteriormente serán representados de manera ordenada para poder localizarlos dentro de sus respectivos cromosomas (Figura 12). Además, el programa calcula el valor de los ratios a partir de los cuales se van a considerar ganancias o pérdidas de las regiones cromosómicas implicadas.

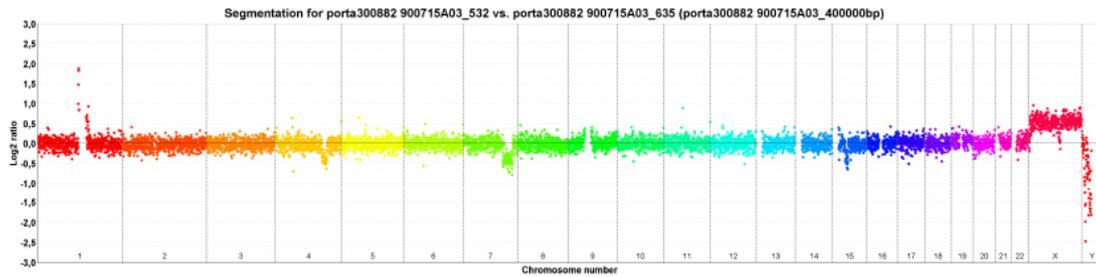


Figura 12. Representación gráfica del análisis de un array NimbleGen en una hibridación varón/mujer. En la figura se representan de manera ordenada desde la región 1p hasta el cromosoma Y y todos los oligonucleótidos incluidos dentro del subarray. Cada color pertenece a un cromosoma.

3. HIBRIDACIÓN IN SITU FLUORESCENTE

Los clones seleccionados para los estudios de HISF tanto en los LEZM como en los LDCGB fueron elegidos de la librería del Instituto “Wellcome Trust Sanger”, Cambridge, Inglaterra. Todos estos clones fueron hibridados sobre metafases de individuos sanos con el fin de verificar su localización. Las hibridaciones se realizaron sobre portas incluidos en parafina o sobre células fijadas mediante Carnoy’s según la disponibilidad de las muestras tumorales y se analizaron un total de 400 núcleos en interfase para cada muestra. Como controles normales se usaron 10 ganglios reactivos en parafina y células fijadas de 10 controles sanos. La HISF de las muestras en parafina se realizó sobre cortes de 4-5 μm de espesor. El grosor del corte es importante ya que tanto si es más fino como si es más grueso la HISF no será analizable. Si el tamaño de los cortes supera los 5 μm de espesor la desparafinización del tejido es más difícil, dando una hibridación ineficiente, así como, si el tamaño es inferior a 4 μm los núcleos pueden aparecer incompletos produciéndose falsos positivos. Además conviene eliminar las áreas en las que los núcleos están solapados o las zonas en las que el tejido está parcialmente aplastado. Por tanto, teniendo en cuenta estas recomendaciones y basándonos en los resultados obtenidos al hibridar estas sondas en los

controles normales, el punto de corte para la identificación de las alteraciones se delimitó en >10% de células con un patrón anormal para las células fijadas y para las muestras procedentes de tejido parafinado el punto de corte se situó en el límite >12% (3 señales del BAC para ganancia y 1 señal para pérdida).²¹⁸

3.1. HISF: Marcaje Directo

3.1.1. Marcaje directo de sondas no comerciales mediante nick translation

Reactivos y soluciones:

0.2 mM Spectrum Green dUTP, (Abbott Molecular).

0.2 mM Spectrum Orange dUTP, (Abbott Molecular).

FISH nick translation kit (Abbott Molecular Inc): nucleótidos (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), solución de hibridación (10XNT) y enzima.

Procedimiento:

1. Preparar las siguientes disoluciones:

0.2 mM Spectrum Green dUTP // 0.2 mM Spectrum Orange dUTP.

- 5 µl 1mM Spectrum Green dUTP // Spectrum Orange dUTP
- 20 µl H₂O

0.1 mM dTTP.

- 10 µl 0.3 mM dTTP
- 20 µl H₂O

0.1 mM dNTP mix.

- 10 µl 0.3mM dATP
- 10 µl 0.3mM dCTP
- 10 µl 0.3mM dGTP

2. Las cantidades de los reactivos utilizados están calculadas para realizar el marcaje de 1-3 µg de ADN con lo que se obtiene un total de 50 µl de mezcla de la reacción. Todo el proceso debe hacerse en frío.

- | | |
|-----------------|-------|
| - ADN [1ug-3ug] | X µl |
| - 10xNT | 5 µl |
| - dNTP | 10 µl |
| - dTTP | 5 µl |

- Spectrum Green/Orange 2,5 µl
- H₂O (ajustar hasta 50 µl) Y µl
- Enzima 5 µl

3. Incubar 45 minutos a 15°C.
4. Testar el tamaño de la sonda en un gel de agarosa al 1%. Si el tamaño de la sonda es el deseado, en torno a 300 pb, se inactiva la enzima incubando en un baño durante 10 minutos a 70°C.
5. Como resultado se obtiene la sonda marcada de forma directa a una concentración aproximada de 20 ng/µl. A continuación se puede utilizar en la hibridación o se puede almacenar a - 20°C.

3.1.2. Tratamiento y desnaturalización de las preparaciones

Reactivos y soluciones:

Pepsina.

Formaldehído al 37% (Merck).

Etanol al 70%, etanol al 85% y etanol al 100% (Merck).

Procedimiento:

Se parte de la suspensión celular obtenida por técnicas de citogenética.

1. Depositar las células sobre los portaobjetos.
2. Incubar el portaobjetos en una solución de pepsina al 0.02% en 0,01 N HCL, durante 8 minutos en un baño a 37°C en agitación.
3. Lavar el portaobjetos en una solución de PBS durante 5 minutos a temperatura ambiente y en agitación.
4. Incubar las preparaciones en 2% de formaldehído diluido en PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente y sin agitación.
5. Lavar el portaobjetos en una solución de PBS durante 5 minutos a temperatura ambiente y en agitación.
6. Deshidratar con concentraciones crecientes de etanol: 70%, 85% y 100% durante 3 minutos y dejar secar el portaobjeto.

3.1.3. Tratamiento y desnaturalización de las sondas no comerciales marcadas directamente

Reactivos y soluciones:

Sonda de ADN marcada con “spectrum green” o “spectrum orange”.

ADN Cot-1 humano (Roche).

Acetato sódico 3 M, pH 5,2.

Etanol al 100% a -20°C y etanol al 80% a temperatura ambiente (Merck).

Tampón de hibridación: 1 ml sulfato de dextrano, 3 ml formamida, 0,75 ml agua destilada, 0,25 ml 20X SSC.

Procedimiento:

1. Colocar en un tubo 100 ng de sonda y 20 µl de ADN Cot-1.
2. Precipitar la sonda añadiendo 1,5 µl de acetato sódico 3 M y 50 µl de etanol al 100% a -20°C. Mezclar bien e incubar a -80°C durante 30 minutos.
3. Centrifugar a 12.000 rpm durante 10 minutos a 4°C.
4. Decantar el sobrenadante. Añadir 100 µl de etanol al 80% y centrifugar a 12.000 rpm durante 10 minutos. Eliminar el sobrenadante y dejar secar.
5. Resuspender el ADN con 7 µl del tampón de hibridación y agitar durante 30 minutos a temperatura ambiente.
6. Agregar 7 µl de la sonda desnaturalizada y preanillada sobre el portaobjetos.
7. Cubrir con un cubreobjetos y sellar con pegamento.

3.1.4. Hibridación

Introducir las preparaciones en la estación de hibridación HYbrite (Vysis) para la realización de la desnaturalización de la sonda, 75°C durante 6 minutos, y de la hibridación, 16 horas a 37°C.

3.1.5. Lavados post-hibridación y contratinción

Reactivos y soluciones:

Formamida al 50% / 2X SSC, pH 7,0.

2X SSC.

Solución de contratinción: DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol).

Solución para mantener la fluorescencia: “Vectashield” (Laboratorios Vector).

Procedimiento:

1. Precalentar las dos soluciones, formamida al 50% y 2X SSC en un baño 46°C.

2. Eliminar suavemente el pegamento y los cubreobjetos de las preparaciones, introducir las en el recipiente que contiene la solución de formamida 50% a 46°C. Realizar un lavado de 5 minutos.
3. Realizar un lavado de 2 minutos en la solución de 2X SSC a 46°C.
4. Mantener en DAPI durante 2 minutos y añadir “Vectashield”® para que no se pierda la fluorescencia. Mantener las preparaciones a 4°C y protegidas de la luz.

3.1.6. Adquisición y análisis digital de las imágenes

Equipo:

- Microscopio epifluorescente con rueda de filtros (DAPI, FITC, TRITC).
- Cámara CCD fría.
- Sistema de análisis de imagen CYTOVISION (Applied Imaging) o ISIS (Metasystem).

3.2. HISF sobre portaobjetos embebidos en parafina

Para el marcaje y el tratamiento de la sonda se sigue el protocolo descrito en el apartado 3.1.1.

3.2.1. Pretratamiento de portaobjetos

Reactivos y soluciones:

Xilol (Merck).

Etanol absoluto (Merck).

10 Mm Trizma® Base (Sigma).

EDTA (Merck).

Tween-20 (Sigma).

HCl.

Pepsina.

PBS/Na⁺.

Mg₂Cl.

Solución Tris-EDTA (pH 9):

- 1,21g de 10 Mm Trizma® Base
- 0,37g de EDTA
- 500 µl Tween-20

Solución pepsina:

- 10 ml HCl 0,1N

- 90 ml H₂O

Solución de Stop:

- 70ml PBS/Na
- 3,5ml Mg₂Cl 1M

Procedimiento:

1. Colocar los portaobjetos en una estufa a 65°C hasta que se elimine la parafina.
2. Solución de pepsina: precalentar en un baño a 37°C.
3. Introducir los portas en Xilol durante 10 minutos. Eliminar el xilol y añadir de nuevo xilol. Repetir este proceso 3 veces.
4. Realizar dos lavados con etanol absoluto durante 10 minutos.
5. Eliminar el etanol de 100%.
6. Realizar dos lavados con etanol al 90% y al 70%, respectivamente, durante 5 minutos cada uno.
7. Eliminar el etanol de 70% y lavar con abundante H₂O destilada.
8. Dejar secar las preparaciones.
9. Colocar los portas en un recipiente con tampón Tris-EDTA e incubar durante 3 tandas de 15 minutos en un baño a 99°C. Evitar que la solución de Tris-EDTA hierva.
10. Añadir 200 µl de pepsina a la solución de pepsina previamente calentada a 37°C.
11. Introducir los portas en la solución y dejar digerir entre 25 y 45 minutos. El tiempo de digestión dependerá de cómo se haya eliminado la parafina del porta durante el tiempo que han estado en la estufa a 65°C.
12. Pasar los portas a la solución Stop durante 5 minutos.
13. Lavar los portas con H₂O destilada.
14. Dejar secar las preparaciones.

3.2.3. Hibridación

Depositar la sonda en el porta, poner un cubreobjetos, sellar con pegamento e introducir los portas en la estación de hibridación HYbriter (Vysis) con el programa óptimo para la hibridación de sondas en muestras parafinadas.

Programa de hibridación:

Desnaturalización a 83°C durante 7min.

Hibridación a 45°C durante 48 horas.

3.2.4. Lavados post-hibridación y contratinción

Reactivos y soluciones:

Formamida (Merck).

20X SSC.

Solución de formamida al 50% (ajustar el pH a 7)

- 50 ml de formamida
- 10 ml de 20X SSC
- 40 ml de H₂O destilada

Solución de contratinción: DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol).

Solución para mantener la fluorescencia (*antifade*): “*Vectashield*”® (Laboratorios Vector).

Procedimiento:

1. Calentar las soluciones de formamida y 2x SSC en un baño a 46°C.
2. Eliminar el pegamento de sellado y, si es posible el cubreobjetos, sin forzar las células.
3. Realizar un lavado durante 5 minutos con formamida al 50% previamente caliente a 46°C.
4. Realizar un lavado durante 3 minutos en 2X SSC previamente caliente a 46°C.
5. Mantener en DAPI durante 2 minutos y añadir “*Vectashield*”® para que no se pierda la fluorescencia. Mantener las preparaciones a 4°C y protegidas de la luz.

3.2.5. Adquisición y análisis digital de las imágenes

Equipo:

- Microscopio epifluorescente con rueda de filtros (DAPI, FITC, TRITC).
- Cámara CCD fría.
- Sistema de análisis de imagen CYTOVISION (Applied Imaging) o ISIS (Metasystem).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO I: Estandarización de la técnica de Arrays Genómicos

El array genómico es un método de citogenética molecular para la detección de ganancias y pérdidas cromosómicas. Un array genómico es un soporte sólido, generalmente de vidrio, al que se le han adherido, de forma ordenada y mediante un biorobot, clones, secuencias de ADN conocidas, en forma de matriz de miles de puntos equiespaciados. La resolución de los arrays genómicos viene determinada por la distancia genómica que hay entre dos clones consecutivos. Esta técnica está basada en la co-hibridación sobre el array de dos ADN, tumoral y referencia, marcados con diferentes fluorocromos (Cy5, rojo y Cy3, verde). En el caso de pérdida del ADN tumoral, se une menos ADN tumoral al clon correspondiente y prevalecerá el color verde del marcaje del ADN control mientras que las ganancias en el ADN tumoral se identificarán como un predominio del color rojo. Cuando la hibridación es de color amarillo representa que tanto el ADN control como el tumoral tienen el mismo número de copias en el genoma. Durante la hibridación de los arrays genómicos se ha añadido ADN Cot-1 con el fin de reprimir la hibridación sobre las secuencias repetitivas del genoma. En la Figura 5 (página 40) se presentan de manera esquemática los procesos más relevantes en la hibridación de un array genómico. A continuación se refieren los problemas más destacables en la realización de un array genómico y la manera de resolverlos.

1. Obtención de la librería

Para la detección de las alteraciones en el genoma el empleo de los arrays genómicos de BAC/PAC son más apropiados que los de cDNA. Estas librerías de BAC y PAC fueron generadas a partir de la secuenciación del genoma humano. La resolución de esta librería es de 1 Mb, es decir, como mínimo hay un clon por cada megabase de distancia que existe en el genoma.²¹⁹

2. Réplica de la librería: Almacenaje en glicerol de los clones

Al igual que se hace con cualquier cultivo bacteriano, es conveniente la creación de una réplica para así poder almacenar la librería original y utilizar la réplica para los diferentes pasos del proceso de la elaboración del BAC-array. En ocasiones, es necesario sustituir la réplica debido a una mala manipulación de las placas, un almacenamiento inadecuado o a una contaminación cruzada de los pocillos. Además, algunas librerías han sido construidas usando un huésped no resistente a la contaminación por fagos (Ej. DH10B) por lo que siempre son vulnerables a la contaminación por el fago T-1. Asimismo, es recomendable que el almacenaje de la librería original y de la réplica se realicen en ultracongeladores diferentes. Por estos motivos es necesario realizar un réplica en glicerol al 7,5% de cada uno de los clones incluidos en la librería antes de que vayan a ser manipulada para la extracción de los ADN.²²⁰

3. Extracción del ADN del clon inserto en *E. coli*

En este trabajo la extracción del fragmento de ADN humano que está inserto en el vector de clonación (BAC o PAC) e incorporado en la bacteria *Escherichia coli* se ha realizado por dos metodologías, una automatizada mediante un robot, *BIROBOT 3000* (QIAgen, Hilden, Alemania) y otra manual. Mediante la técnica automatizada se han extraído un total de 901 ADN de los incluidos en la librería. La segunda metodología se basa en una lisis alcalina y en una extracción con fenol-cloroformo. Debido a los requerimientos intrínsecos de la extracción del ADN con el Biorobot 3000 y según el protocolo que proporciona QIAgen, el volumen inicial de cultivo bacteriano fue de 2,5 ml y el volumen final de 25 µl. En la extracción manual estas cantidades no son específicas por lo que se decidió que el volumen inicial de cultivo bacteriano fuese de 13 ml y el volumen final de 100 µl. Esta es la única diferencia que encontramos entre ambas metodologías ya que en lo

referente a la calidad del ADN no existían diferencias apreciables. Por tanto, la calidad y la cantidad de ADN obtenido por ambas técnicas fueron similares (Tabla 15).

Tabla 15. Comparativa entre los dos métodos de extracción de ADN empleados en la realización del array genómico.

Clon	Biorobot 3000* (QIAGEN)		Manual** (Lisis alcalina)	
	Concentración (µg/µl)	Ratio (260/280)	Concentración (µg/µl)	Ratio (260/280)
bA3K16	1,5	1,57	1,84	1,42
bA58K22	1,9	1,69	1,81	1,45
bA148D6	2,1	1,73	0,82	1,38
bA363L24	1,8	1,72	1,29	1,54
bA445L6	2,0	1,59	1,21	1,60

* Volumen inicial de cultivo: 2,5 ml; volumen final: 25 µl

** Volumen inicial de cultivo: 13 ml; volumen final: 100 µl

4. Amplificación de los ADN extraídos de los cultivos de *E. coli*

Tras la extracción y la comprobación de su calidad, se procedió a la amplificación de los ADN. A cada ADN se le realizaron tres amplificaciones mediante DOP-PCR con tres cebadores diferentes. Los cebadores DOP1, DOP2 y DOP3 tienen seis bases en su extremo 3' que son significativamente menos frecuentes en el ADN de *E. coli* y sin embargo, tienen una alta frecuencia en el ADN humano. Las secuencias de las 6 bases de los tres cebadores se describen en la Tabla 16.

Tabla 16. Secuencias finales en 3' de los tres cebadores de la DOP-PCR y su frecuencia en el ADN de *E. coli* y en el ADN humano.

Cebador	Secuencia 3'	<i>E. coli</i>	Humano
DOP 1	CTAGAA	0.02	0.63
DOP 2	TAGGAG	0.05	0.49
DOP 3	T TCTAG	0.02	0.63

Estos tres cebadores se han diseñado para ser ineficientes en la capacidad de amplificación del ADN de *E. coli*, reduciendo considerablemente la contaminación por ADN

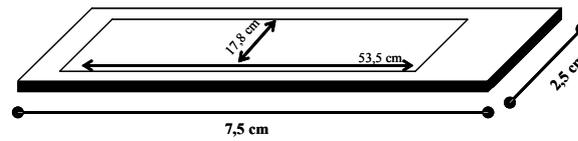
de la bacteria. Sin embargo, conservan su capacidad de generar una buena representación del ADN humano.²¹⁶ Además, la combinación de los tres productos obtenidos a partir de las tres reacciones de amplificación mejora la fiabilidad y la reproducibilidad de los arrays genómicos.²²¹

Para la realización de este trabajo doctoral se han empleado los portas Ultragaps con un recubrimiento de aminosilano. La mezcla de los productos precipitados de las 3 DOP-PCR se disolvieron en una solución de DMSO al 50%. Esta solución se usa por su carácter desnaturalizante, su nivel bajo de evaporación y además porque se puede mantener a 4°C durante varios años.²²¹

5. Depósito de las sondas sobre el soporte sólido

El mejor sustrato para realizar los BAC-array es el vidrio debido a su disponibilidad, fácil manejo, baja fluorescencia intrínseca, transparencia, resistencia a las altas temperaturas, rigidez física y a la gran posibilidad de variar el recubrimiento químico de su superficie. La naturaleza no porosa del vidrio hace posible que las muestras que se hibridan tengan contacto directo con los clones evitando una difusión interna y reduciendo los problemas del ruido de fondo.

El depósito de los clones en la superficie del porta ultragaps se realizó mediante la técnica de *pin deposition* con el robot *Microgrid II* (Biorobotics Ltd., Cambridge, Inglaterra). En esta técnica se emplean unas agujas o pins que, por capilaridad, toman una gota de la solución que contiene la muestra resuspendida, en DMSO al 50%, y al hacer contacto el extremo de la aguja con la superficie del array, se imprime una gota en una posición determinada de la superficie. El proceso de depósito requiere unas condiciones idóneas de temperatura, 20-22°C, y de humedad, entre el 45 y 55% (Figura 13).



Dimensiones del portaobjetos	7,5 x 2,5 cm
Dimensiones de la zona de depósito	53,5 x 17,8 mm
Distancia entre los puntos	0,29 mm
Máximo número de puntos en la superficie del portaobjetos	14.400
Volumen de la gota en el portaobjetos	20 nl
Diámetro de la aguja de depósito	0,4 mm
Diámetro del punto	150 μ m

Figura 13. Características del depósito de los clones sobre el portaobjetos de vidrio mediante el robot Microgrid II (Biorobotics).

Una vez depositados los clones en el portaobjetos el ADN del clon se fija a la superficie del porta a través de calor. En los ultragaps la unión inicial de los productos de DOP-PCR a la superficie es de tipo electrostático entre los grupos amino del portaobjetos y los fosfodiéster de los clones. Posteriormente por la acción del calor o de la radiación ultravioleta, se generan los enlaces covalentes mediados por una reacción radicalaria entre los residuos de timidina de los productos de DOP-PCR y los carbonos del aminoalquil del portaobjetos. Después de este proceso es recomendable guardar los portas en un desecador a temperatura ambiente y evitar el contacto directo con la luz.

5.1. Errores producidos durante el depósito de los clones en el BAC-array

Antes de hibridar las muestras sobre el array es recomendable escanear los portas para verificar que el depósito se ha producido de forma correcta ya que durante el depósito de los clones en el chip se pueden producir varios errores (Figura 14).

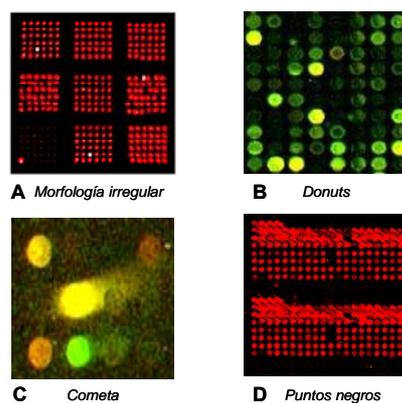


Figura 14. Errores que se producen durante el depósito de los clones sobre la superficie del porta.

5.1.1. La morfología y la posición del punto son irregulares

Esto puede deberse a que las agujas estén atascadas o rotas, o a que estén taponadas con sales u otros materiales porque no se produce correctamente el lavado de las mismas o porque la solución de depósito se ha evaporado. Para subsanar este problema se debe comprobar el volumen de producto que existe en las placas en donde están los clones y el estado de las agujas de depósito (Figura 14 A).

5.1.2. Puntos con forma de “donuts”

Este problema tiene dos posibles causas: que la humedad durante el depósito sea inferior al 45% o a que la superficie del porta haya sufrido algún daño. La única solución a este error es volver a realizar el proceso de depósito sobre portaobjetos nuevos controlando que la humedad nunca sea inferior al 45% (Figura 14 B).

5.1.3. Formación de puntos como cometas

Puede ocurrir por un exceso de la concentración de ADN o porque el área donde se va a producir el depósito no está totalmente seca. Si ocurre este error habrá que controlar la concentración de ADN de los clones y si fuese necesario habría que diluir los ADN con la solución de depósito (Figura 14 C).

5.1.4. Aparición de puntos negros

Es debido a que la intensidad de la señal es muy baja y es mayor la señal que produce el ruido de fondo. Este error puede deberse a una baja eficiencia de las DOP-PCR por lo que habría que volver a realizar las tres DOP-PCR para esos ADN (Figura 14 D).

Además del tipo de porta empleado en este trabajo existen otros tipos de recubrimientos químicos de la superficie de los portas y otras formas de inmovilización de las sonda a la superficie de los portas. En la Tabla 17 se describen las diferentes casas comerciales, sus productos, los diferentes tipos de recubrimientos químicos y el producto óptimo para depositar en cada porta.²²²

Tabla 17. Tipos de portaobjetos para la realización de un array genómico, distintos recubrimientos, casas comerciales y tipo de sonda que es la idónea para el depósito de la sonda sobre cada portaobjetos.

Compañía	Producto	Recubrimiento químico	Uso Óptimo
Amersham Bioscience	CodeLink	Marca registrada	Oligonucleótidos
Apogent Discoveries	EZ-Rays aminosilane EZ-Rays Pure	Aminosilano Marca registrada	Productos PCR Oligonucleótidos modificados
Asper Biotech Ltd	Genorama	Aminosilano Unión aminosilano	ADN no modificado ADN modificado con secuencias cortas amino
Bio Express	EasySpot Universal EasySpot Oligo	Marca registrada Mezcla de epóxidos	Oligonucleótidos/productos de PCR Oligonucleótidos
Bioslide Technologies	Precision CT-Clean Precision CT-Amine Precision CT-Aldehyde Precision CT-Epoxy	Ninguno Unión amino covalente Unión aldehído covalente Epóxido	Oligonucleótidos/productos de PCR Productos de PCR modificados con grupo amino/oligonucleótidos ADN amino modificado
Corning	Gaps II UltraGaps	Aminosilano Aminosilano	Productos de PCR Oligonucleótidos/Productos de PCR
Eppendorf	Creative Chip PCR Creative Chip Oligo	Marca registrada Marca registrada	Productos de PCR Oligonucleótidos
Erie Scientific	UltraClean SuperChip	Aminopropilsilano	Producto de PCR/Oligonucleótidos
Full Moon Biosystems	cDNA slides Oligo slides	Marca registrada Marca registrada	Productos de PCR Oligonucleótidos
GeneScan	ArrayLink	Epoxysilano	ADN amino modificado
Genetix	Amino coated slide Aldehyde coated slide	Amino Aldehído	Producto de PCR/Oligonucleótidos Producto de PCR modificado amino y Oligonucleótidos
Pall Corporation	Vivid	Porta con membrana	Producto de PCR/Oligonucleótidos
PerkinElmer Life Sciences	Micromax SuperChip I UltraClean I	Amino	Producto de PCR
Quantifoil	QMT-Epoxy QMT-Aldehyde QMT-Amino	Epóxido Aldehído Amino	ADN modificado amino ADN modificado amino Producto de PCR
Schleicher and Schuel	Fast Slides	Porta de nitrocelulosa	Producto de PCR/Oligonucleótidos
Telechem	Superamine Superaldehyde Superclean	Unión amino covalente Unión aldehído covalente	Producto de PCR/Oligonucleótidos Producto de PCR amino modificado y Oligonucleótidos

5.2. Depósito de las sondas por triplicado

Los clones incluidos en el array fueron 3.523 además de los clones de *Drosophila melanogaster*, *Schizosaccharomyces pombe* y solución de depósito como controles negativos de la hibridación, y diluciones seriadas de mezclas de los productos de las DOP-PCR de diferentes clones como controles positivos. Dependiendo del número de clones, del tamaño del punto y de la distancia entre los puntos es preferible incorporar réplicas de cada clon en un mismo array.²²¹ Nuestro array constaba de 10.800 puntos porque los clones fueron depositados por triplicado en diferentes zonas del array para evitar perder el menor número posible en el caso de que se produjeran algunos de los errores descritos anteriormente. Además, otro problema que debe evitarse es la aparición de burbujas. En el lugar donde queda una burbuja no se produce el contacto entre la mezcla de hibridación y la superficie del porta, es decir no se va a producir hibridación, por lo que esos puntos hay que eliminarlos del análisis porque para que un clon sea analizable al menos tiene que tener valores para dos de los puntos del triplicado, si se han tenido que eliminar dos de los tres puntos ese clon no sería analizable por no ser representativo y habría que eliminarlo.^{47;106}

6. Nivel de resolución de los arrays genómicos

En el cariotipo convencional la resolución de un experimento viene definida por el número de bandas que pueden ser visualizadas. En los arrays genómicos la resolución está determinada por la distancia genómica que existe entre dos clones contiguos, por lo que no ha dejado de mejorar.²¹⁹ La resolución del array que se ha generado para la realización de este trabajo doctoral es de 1 Mb. El tamaño medio de los insertos fue de 165 Kb (rango entre 80 y 200 Kb) de manera que en una hibridación óptima era posible identificar los cambios en el número de copias mayores de 80 Kb.

7. Hibridación

Para la hibridación del array se seleccionaron diferentes ADN genómicos de individuos sanos, además del ADN extraído de tejido de placenta. El ADN de placenta tenía menos cambios en su genoma por lo que fue seleccionado como ADN control en las posteriores hibridaciones. Para poder analizar las muestras que estaban incluidas en parafina fue preciso obtener ADN de tejido de ganglio de individuos sanos incluido en bloques de parafina. La metodología de extracción de todos los ADN empleados en este trabajo, ADN extraído de tejido fresco, de tejido incluido en parafina y de células fijadas, se describe en el apartado de Material y Métodos: extracción de ADN (páginas 51-55).

En el proceso de la hibridación los ADN, después de la digestión con la enzima *DpnII*, se marcan con los fluorocromos Cy3 para el ADN de referencia o control y Cy5 para el ADN tumoral. Un paso importante tras el marcaje es equiparar la cantidad de ADN marcado con el fluorocromo Cy5 a la cantidad de ADN marcado con el Cy3. Para este proceso se igualan los picomoles calculados a partir de las diferentes intensidades de longitud de onda tanto de absorción como de emisión de los dos fluorocromos. La hibridación que se produce en los arrays genómicos es una hibridación competitiva entre los dos ADN, referencia y tumoral, junto con ADN Cot-1. Vermeesch y cols optimizaron la concentración de Cot-1 a 1 µg/µl. Durante la optimización de la cantidad de Cot-1 observaron que tanto el defecto como el exceso de Cot-1 incrementaban la desviación estándar (DS) en los análisis de los arrays genómicos (Figura 15).²¹⁷

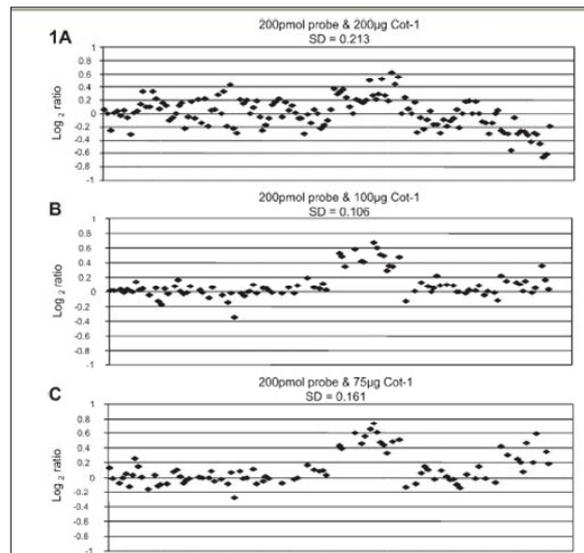


Figura 15. Análisis del cromosoma 9 de un paciente con duplicación en 9q22.33-q31.1 utilizando diferentes concentraciones de ADN Cot-1 (indicados en cada gráfica). Para cada gráfica el eje de abscisas representa los clones del cromosoma 9 de acuerdo a su posición descrita en la web Ensembl.org en Febrero de 2004. En el eje de ordenadas se representan los log₂ de cada clon.²¹⁷

Cabe destacar que a los ADN que se han obtenido de tejido incluido en parafina no deben digerirse con *DpnII* debido a que este ADN ya está fragmentado y tiene el tamaño apropiado para el marcaje con los fluorocromos Cy3 y Cy5 (Figura 16).²²³

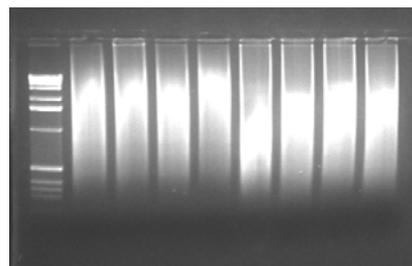


Figura 16. Extracción de ADN de tejido incluido en bloques de parafina. En el primer carril del gel de agarosa se carga el marcador de peso molecular y en los carriles sucesivos los ADN extraídos de las muestras. En la imagen se aprecia que los ADN extraídos ya están fragmentados por lo que es innecesaria la digestión con la enzima de restricción *DpnII*.

8. Análisis

8.1. Adquisición de la imagen

Tras la co-hibridación de los ADN humanos sobre el array generado con los clones (BAC/PAC) de la librería es preciso adquirir la imagen resultante de la hibridación. Las imágenes se obtuvieron mediante el escáner GenPix 4000B (Axon Instruments, Burlingame, California, EEUU). Este escáner actúa excitando cada fluorocromo con el que se ha marcado cada ADN mediante una luz monocromática producida por un láser y recogiendo la luz de emisión (fluorescencia) convirtiendo la corriente de fotones en valores digitales que pueden ser almacenados como un archivo de imagen (.TIFF). A cada fluorocromo le corresponden dos longitudes de onda: una de excitación y otra de emisión. Las longitudes de onda de emisión son de 532 nm para el fluorocromo Cy3 y de 635 nm para el Cy5.

Por cada hibridación el escáner produce dos archivos de imagen, uno para cada fluorocromo, que se presentan en una sola imagen resultante de la superposición de las imágenes generadas para cada fluorocromo. Cuando las intensidades de las señales de un punto en ambas imágenes son similares, ese punto mostrará un color amarillo (Figura 17).

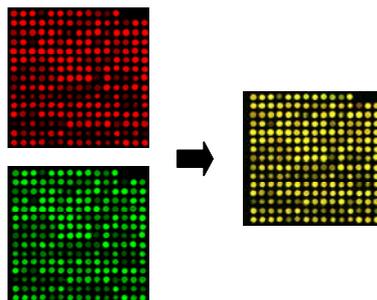


Figura 17. Imagen de la hibridación de muestras controles en el array genómico. En la parte de la izquierda se pueden observar las imágenes obtenidas para cada fluorocromo, Cy5 en rojo y Cy3 en verde. La composición de ambas imágenes da como resultado una nueva imagen en la que se pueden observar un rango de colores desde el rojo hasta el verde pasando por el color amarillo que significaría la normalidad, hay la misma cantidad del ADN control que del ADN tumoral.

8.2. Análisis de la imagen

El análisis de la imagen puede separarse en tres etapas:

8.2.1. Identificación de cada punto con su clon correspondiente

Para poder identificar cada punto del array es necesario el ajuste de una red que empareja cada señal de hibridación con el nombre del clon de la librería. La malla o red consta de 48 bloques con 225 puntos cada uno. El ajuste de la malla se realiza de manera semiautomática. A veces se observan variaciones durante la hibridación del array que pueden causar irregularidades significativas en la imagen por lo que es necesario revisar cada clon de cada cuadrante de la malla para ajustar, en caso de que fuese necesario, el diámetro del punto con la región de la malla para ese punto (Figura 18).

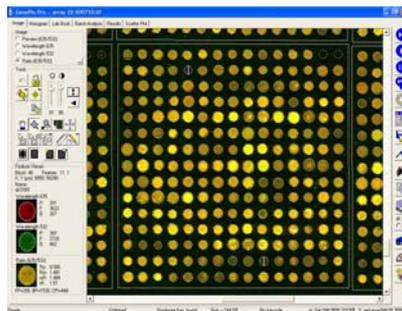


Figura 18. Programa para la identificación de cada punto depositado en el portaobjetos. Mediante el programa GenePix Pro 4.0 es posible la identificación de cada punto impreso en el portaobjetos con su clon correspondiente. Además, este programa nos permite visualizar cada fluorocromo independientemente y así poder determinar si la hibridación de ambos ADN, tumoral y control, sobre cada uno de los clones depositados en el array se ha producido correctamente. Además, se pueden observar los controles internos del array, tanto los positivos como los negativos.

8.2.2. Segmentación

La segmentación de la imagen es el proceso de división en dos regiones diferentes. La segmentación es necesaria para identificar dentro de cada punto los píxeles que corresponden a la hibridación entre los ADN humanos con el ADN del clon. La segmentación de la imagen permite la clasificación de los píxeles como *foreground* (intensidad del punto) o *background* (intensidad del ruido de fondo) utilizando una máscara para cada punto. Existen diferentes

métodos de segmentación que pueden ser categorizados en cuatro grupos de acuerdo a la geometría de los puntos que ellos producen (Tabla 18).²²⁴ El programa del GenePix Pro 4.0 realiza la segmentación con círculo adaptativo.

Tabla 18. Tipos de segmentación que se pueden aplicar para el análisis de los arrays genómicos.

Círculo Fijo		Círculo Adaptativo		Forma Adaptativa	Histograma	
Ventajas	Desventajas	Ventajas	Desventajas	Ventajas	Ventajas	Desventajas
Fácil de implantar. Funciona bien si todos los puntos son circulares y del mismo tamaño	Se obtienen resultados imprecisos cuando los puntos tienen forma invariable	Fácil de implantar. Funciona bien si todos los puntos son circulares y del mismo tamaño	Una malla circular tiene un mal ajuste, rara vez los puntos son circulares en la práctica	Región sembrada creciente. Este método detecta con más precisión los puntos, ya que se adapta a sus formas reales	No necesita información espacial	Puede producir puntos no conexos

8.2.3. Extracción de las intensidades

Para generar el valor numérico de las intensidades de los puntos se extraen dos valores: la intensidad del punto y la intensidad del ruido de fondo para los dos canales (rojo y verde) de cada punto del array. En un principio se pensaba que era necesario eliminar de la intensidad total la del ruido de fondo debido a que esta señal podría generar una medición errónea de la intensidad. En la actualidad se ha comprobado que con la sustracción de la intensidad del ruido de fondo a la intensidad del punto se cometían muchos errores. Por ejemplo, podía ocurrir que la señal producida por el ruido de fondo fuese mayor que la del punto por lo que al sustraer la intensidad del ruido de fondo se producirían valores negativos de intensidad.²²⁵ Al aplicar el logaritmo de las intensidades estos valores negativos se pierden resultando una pérdida de información.²²⁶

Como resultado de estos tres procesos de análisis de la imagen con el programa GenePix Pro 4.0 se genera un archivo “.gpr” en el que se obtienen datos cualitativos y cuantitativos para cada una de los clones incluidos en el array. Estos archivos contienen entre otros datos, medidas cuantitativas como las intensidades del punto y del ruido de fondo:

medias, medianas, logaritmo del ratio (635/532) de cada canal para cada uno de los puntos depositados en el array y medidas cualitativas como son las medidas de variabilidad y tamaño del punto, entre otros (Tabla 19).

Tabla 19. Datos obtenidos tras el análisis con el programa GenPix Pro 4.0. Para cada uno de los puntos incluidos en el array se obtienen, además de la identificación con su clon correspondiente, otras medidas necesarias para la cuantificación de las intensidades de fluorescencia emitidas por cada fluorocromo.

Block; Column; Row; Name; ID; X; Y; Diametro; F635 Median; F635 Mean; F635 SD; B635 Median; B635 Mean; B635 SD; % > B635+1SD; % > B635+2SD; F635 % Sat.; F532 Median; F532 Mean; F532 SD; B532 Median; B532 Mean; B532 SD; % > B532+1SD; % > B532+2SD; F532 % Sat.; Ratio of Medians (635/532); Ratio of Means (635/532); Median of Ratios (635/532); Mean of Ratios (635/532); Ratios SD (635/532); Rgn Ratio (635/532); Rgn R ² (635/532); F Pixels; B Pixels; Sum of Medians; Sum of Means; Log Ratio (635/532); F635 Median - B635; F532 Median - B532; F635 Mean - B635; F532 Mean - B532; Flags
--

9. Normalización

La normalización es el ajuste de los efectos que son debidos a variaciones en la tecnología y no al origen biológico de la muestra que se ha hibridado. El objetivo de la normalización es poder ajustar las intensidades de las señales con el fin de poder compararlas con las obtenidas en la misma hibridación y con las generadas en otras hibridaciones. Con este proceso se consigue identificar, corregir y minimizar las diferencias debidas a la preparación de la muestra, al marcaje con los fluorocromos Cy3 y Cy5, a las diferencias en la hibridación, en la fotodetección, en la autofluorescencia, etc. Aunque no existan diferencias en cuanto al marcaje de los ADN ni en la adquisición de la imagen post-hibridación, sí hay diferencias en cuanto a la distribución de las intensidades de las señales en el array (Figura 19). La normalización es necesaria para asegurar que las diferencias entre las intensidades se deben a diferencias de expresión real y no a artefactos producidos por el depósito de los clones en el array, a la hibridación o al escaneo. Por tanto, es un paso previo a cualquier otro análisis estadístico.

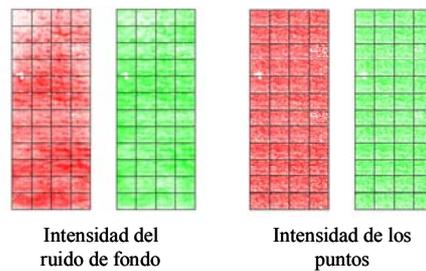


Figura 19. Distribución de las intensidades en el array. En la imagen de la izquierda se representa la intensidad de la señal del ruido de fondo en el array y en la imagen de la derecha la intensidad de los puntos. Puede apreciarse que la señal del ruido de fondo no se distribuye de manera homogénea por todo el array, sin embargo la intensidad debida a la hibridación sobre los clones impresos en el array sí tiene una distribución homogénea por todo el array.

En los arrays genómicos se pueden aplicar diferentes tipos de normalización (Tabla 20).

Tabla 20. Tipos de normalización.

Nombre	Descripción
Ninguna	No se realiza ninguna normalización
Mediana o Global	Normalización global por medianas
Lowess	Normalización global dependiente de A (media debida a la fluorescencia)
Print Tip Lowess (GEPAS)	Normalización A dependiente, dentro del grupo que determina cada aguja, utilizando la función lowess
Two D	Normalización espacial utilizando la función lowess
Scale Print Tip MAD	Normalización A dependiente, dentro del grupo de cada aguja utilizando la función lowess, seguida de una normalización de escala dentro de cada grupo utilizando la función de la desviación absoluta de las medianas (MAD)

La normalización por “Print Tip” moviliza la nube de puntos hacia el valor 0 de M (valor del \log_2 del ratio), solucionando los errores sistemáticos debidos a las agujas. La normalización por medianas es ideal para normalizar entre arrays, modifica las medianas de cada array, dándole valor 0 a cada una. La normalización más drástica es la que modifica la escala entre los array. Con este tipo de normalización además de igualarse las medianas se

igualan los cuartiles por lo que si no existen diferencias muy marcadas entre los arrays no se recomienda usar esta normalización.²²⁷

9.1. Normalización global o manual

Los métodos globales asumen que las intensidades de los colores rojo y verde están relacionadas mediante un factor constante (rojo= K verde), y que el centro de la distribución de los \log_2 de los ratios están alrededor de 0. El parámetro escogido para la localización es la mediana o la media de las intensidades de los \log_2 de los ratios del conjunto de los clones.²²⁸

Una vez escaneada la imagen los valores de las intensidades de cada punto se transformaron en \log_2 de los ratios mediante el GenePix Pro 4.0. Todos los pasos posteriores se realizaron en el programa Excel. En este tipo de archivo se comienza a trabajar con la mediana (M_e) de los \log_2 del ratio (Cy5/Cy3) de cada punto del triplicado. Se calcula la mediana de las medianas de este valor, el \log_2 para cada clon y la desviación estándar (DS) del triplicado. Se eliminaron los puntos en los que mediante una visión global sólo sea válida una copia del triplicado, los cromosomas sexuales y todos los clones cuya DS del triplicado del punto sea mayor de 0,3.^{47;106} Por tanto, en el análisis sólo quedaron los clones cuya DS es menor de 0,3; los clones que al menos tenían dos copias del triplicado y los clones que pertenecían a los cromosomas autosómicos. De todos estos clones se calculó la mediana, la DS total, y el valor de la mediana más/menos 3 veces la DS. Este último valor, la mediana más/menos 3 veces la DS ($M_e \pm 3 * DS$), es el que determinó el rango de valores de ganancias y pérdidas que se consideró en los diferentes análisis.²²⁹

Se realizaron una serie de hibridaciones normal frente a normal que se usaron para definir la variabilidad de cada clon. Los clones que mostraron una gran variación en dos o más hibridaciones fueron excluidos de los análisis posteriores. El primer propósito de las hibridaciones fue analizar la localización de los posibles oncogenes o genes supresores de tumores y usar un método estadístico sencillo para determinar las ganancias y las pérdidas.

En estas hibridaciones se consideró que todos los clones que tuvieran un valor por encima de $[M_e+3*DS]$ eran ganancias en el genoma y los valores que tenían un valor menor que $[M_e-3*DS]$ fueron considerados pérdidas.^{230;231} Por consiguiente el valor medio de las DS de todos los controles hibridados fue de 0,14 y el límite de los cambios genómicos fue de +0,42 para las ganancias y -0,40 para las pérdidas (Tabla 21).

Tabla 21. Análisis de los controles hibridados sobre el CGH-array.

	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12	C13	C14	Media total
Mediana	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.01	0.02	-0.01	0.01	0.01	0.01	-0.01	0.00	0.00
DS	0.10	0.09	0.10	0.12	0.15	0.16	0.11	0.14	0.20	0.16	0.20	0.13	0.19	0.10	0.14
Mediana+3*DS	0.30	0.29	0.31	0.35	0.47	0.48	0.34	0.44	0.59	0.50	0.61	0.41	0.55	0.31	0.42
Mediana-3*DS	-0.30	-0.28	-0.31	-0.35	-0.45	-0.47	-0.32	-0.41	-0.61	-0.48	-0.59	-0.40	-0.57	-0.31	-0.40

Mediana; DS (desviación estándar); Mediana más 3 veces DS; mediana menos 3 veces DS; media total: mediana hallada con los valores obtenidos para cada control.

9.2. Normalización “Print-tip lowess” o GEPAS

Otro método de normalización que se puede utilizar en el array genómico es la normalización por “print tip lowess”. Con este tipo de normalización se eliminan las diferencias que pueden existir en cuanto a la forma con la que cada aguja deposita la muestra de ADN de los BAC/PAC sobre el array, por lo que el ajuste se lleva a cabo para cada aguja por separado. Este tipo de normalización es la más básica y se basa en un “print-tip lowess”, es decir, se realiza una normalización de cada punto del array por separado. Con este tipo de normalización, la mayoría de los clones incluidos en el array están incluidos en la normalización. A priori se asume que no hay diferencias en el número de copias de material genómico entre las dos muestras que se han hibridado juntas.

Esta normalización se ajusta a una regresión lineal robusta entre la relación de M y A; (M: diferencia en los logaritmos de los ratios y A: media debida a la fluorescencia).

$$M = \log_2 \text{ratio } 635/532 \quad A = 0.5 * (\log 635 + \log 532)$$

El valor normalizado de M corrige los efectos de la disposición de los puntos en el espacio además de los valores relacionados con la intensidad.

9.2.1. Representaciones gráficas

Es útil realizar gráficos que permitan examinar los resultados de cualquier experimento de array. Un gráfico puede ayudar a evaluar el éxito de un experimento, puede guiar la elección de herramientas de análisis y puede resaltar problemas específicos. Los tipos de gráficos que se han usado en este trabajo doctoral han sido:

9.2.1.1. MA-Plot

En este tipo de gráfico en el eje Y se representan los valores de M (log del ratio) y en el eje X los valores de A (medidas de fluorescencia). Un gráfico MA-Plot ideal es aquel en el cual la nube de puntos se encuentra sobre el valor 0 del eje M (Figura 20). Todas las variaciones que se producen con respecto al gráfico ideal se deben a errores sistemáticos vinculados con varios factores: diferencias en la eficiencia en la incorporación de los nucleótidos, diferencias en la cantidad de ADN, en los parámetros del escaneado o diferencias entre las agujas, entre otros.

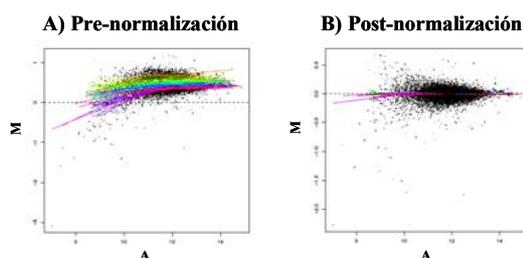


Figura 20. Gráfico M-A plot de un array genómico. A) M-A plot de los datos sin normalizar; B) M-A plot de los datos de un array después de la normalización.

9.2.1.2. Boxplot

Los gráficos de Boxplot pueden ser útiles para comparar los valores de M entre los arrays. Un boxplot muestra gráficamente cinco números resumen, los tres cuartiles que

determinan el 25%, el 50% y el 75% de los datos, el máximo y el mínimo. La caja central del gráfico que va desde el primer cuartil hasta el tercero encierra el 50% de los datos (Figura 21).

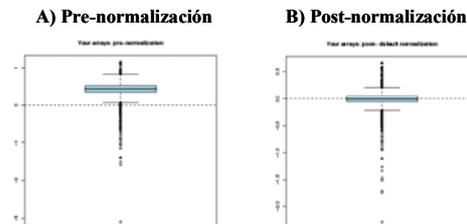


Figura 21. Box-plot generado en el análisis de un array genómico. A) Box-plot de los datos del array genómico antes de la normalización; B) Box-plot de los datos del array genómico tras la normalización.

Los gráficos boxplot también se pueden realizar en función de la agujas (Figura 22).

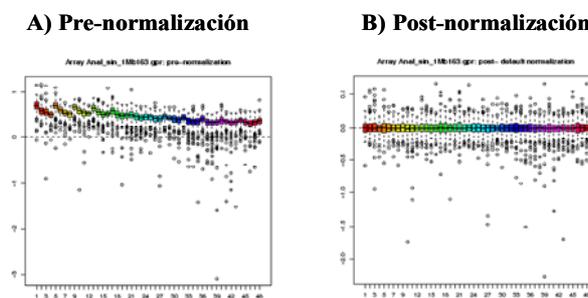


Figura 22. Box-plot generado en el análisis de un array genómico. A) Box-plot de los datos del array genómico antes de la normalización; B) Box-plot de los datos del array genómico tras la normalización. En la imagen cada cuadrado representa los puntos que han sido depositados en el array por cada aguja.

Estos gráficos no deberían representar ninguna variación en función de las agujas (“print-tip”).

9.2.1.3. Gráficos espaciales

Los gráficos espaciales son gráficos de dos dimensiones en el que cada punto representa un estadístico del punto del array (Figura 23). Estos gráficos se pueden utilizar para explorar la calidad de la hibridación de cada array.

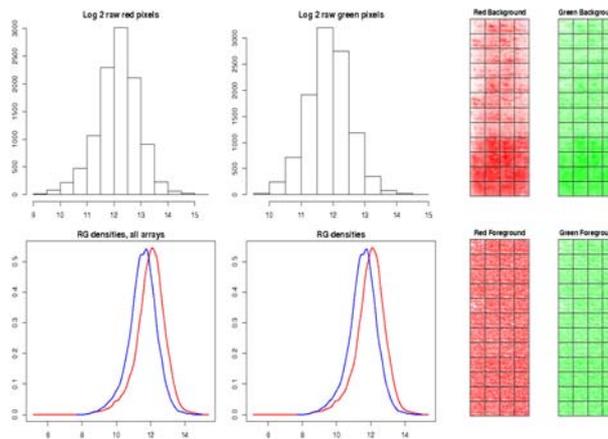


Figura 23. Gráfico espacial de un array genómico. Análisis de las intensidades de ambos fluorocromos. En la parte superior se observa que las intensidades de cada fluorocromo se ajustan a una curva normal. La parte de la derecha representa como se han distribuido las señales de fluorescencia para cada uno de los fluorocromos tanto la señal de intensidad como la de ruido de fondo.

9.3. Normalización por segmentación binaria (CBS)

La normalización de los datos de los arrays genómicos mediante CBS consiste en realizar una segmentación binaria de los datos que eliminará todos los errores que se producen en el proceso de hibridación de las muestras. Se van a obtener segmentos dependiendo de cómo estén alterados los BAC. Una vez que hemos obtenido los valores de los \log_2 de cada clon y mediante el programa “aCGHbase” se calculan los segmentos que existen dentro de cada array. Este número es variable, puede ser que sólo exista un segmento para cada cromosoma o que dentro de un mismo cromosoma obtengamos varios segmentos. Cada uno de los segmentos que se obtienen tienen el mismo valor, es decir todos los clones que están dentro del mismo segmento, están alterados de la misma manera.^{232,233} El siguiente

paso en la normalización por CBS es hallar la mediana del triplicado de cada clon y la moda de todas estas medianas. La moda puede ser única o puede ser que existan tantas modas como número de clones. Este valor depende de cómo está la hibridación, de manera que cuanto mayor sea el número de modas peor será la hibridación. En el caso de que existan varias modas el siguiente paso es calcular la mediana de las modas. A continuación se calcula el valor de la mediana menos la moda para cada clon, la DS de cada segmento y la mediana de las DS. El valor obtenido de la mediana de las DS se multiplica por un factor de corrección (+- 1,25) y el resultado es el valor a partir del cual se van a considerar ganancias o pérdidas dependiendo si el valor es positivo o negativo, respectivamente.

10. Selección del método de análisis

El proceso de normalización en los experimentos de arrays es un paso crítico hasta el punto de que la calidad de los datos obtenidos puede depender del método para analizar escogido. Para realizar una comparación de los tres métodos de normalización: global o manual, *print-tip lowess* o GEPAS y CBS, descritos en el apartado anterior, se seleccionaron un grupo de muestras pertenecientes a individuos sanos, pacientes diagnosticados de LEZM y pacientes diagnosticados con LDCGB. De los 20 casos seleccionados 6 pertenecían a controles sanos cuya muestra procedía de sangre periférica, 2 a controles sanos de donde el ADN fue extraído de tejido normal incluido en parafina; 6 procedían de tejido de bazo de pacientes diagnosticados de LEZM y otras 6 a ganglios de pacientes con LDCGB. Se cuantificaron las regiones alteradas, tanto ganadas como pérdidas, en cada uno de los casos normalizados por los tres métodos (Tabla 22).

Tabla 22. Comparativa entre tres métodos de normalización empleados en el estudio de los arrays genómicos.

	CBS		GEPAS		Global		
	*Regiones ganadas	*Regiones perdidas	*Regiones ganadas	*Regiones perdidas	*Regiones ganadas	*Regiones perdidas	
Control	1	0	16	0	0	1	
	2	2	6	0	1	0	
	3	3	41	0	0	4	
	4	3	17	0	0	1	
	5	0	16	1	1	0	6
	6	25	7	0	0	0	2
	7	14	2	0	1	0	0
	8	28	2	23	1	147	1
LEZM	1	0	4	0	0	0	
	2	57	6	29	0	0	
	3	0	8	14	10	10	25
	4	5	25	4	7	0	0
	5	98	6	35	13	0	0
	6	1	5	0	1	0	0
LDCGB	1	37	32	22	19	31	21
	2	5	247	125	152	135	179
	3	0	6	0	1	0	0
	4	46	0	24	0	36	3
	5	73	1	93	18	117	35
	6	88	0	93	51	95	75

*Número de regiones ganadas o perdidas dependiendo del método de análisis empleado en los BAC-array

Como se puede apreciar los dos métodos de análisis que más se aproximan entre si son el método propuesto por el GEPAS y el método de normalización global o manual. En el análisis de los controles la normalización por CBS es el método que más discrepa debido a que en el diagrama de cajas de las muestras que se han normalizado por CBS el valor central de las intensidades extraídas del array no es cero y para que el método de normalización sea el idóneo este valor tiene que ser igual a cero (Figuras 24, 25, 26, 27 y 28).

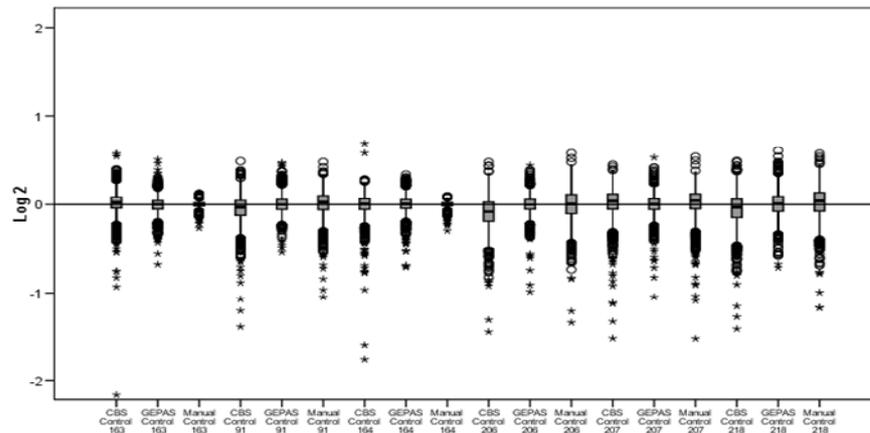


Figura 24. Boxplot resultante de la normalización de los controles extraídos de sangre periférica hibridados en el array. Cada una de las cajas del boxplot corresponde a un control normalizado con un método de análisis. Las tres primeras cajas pertenecen al mismo control normalizado por el método CBS, GEPAS y Manual, las tres cajas siguientes al segundo control normalizado por el método CBS, GEPAS y Manual, y así sucesivamente.

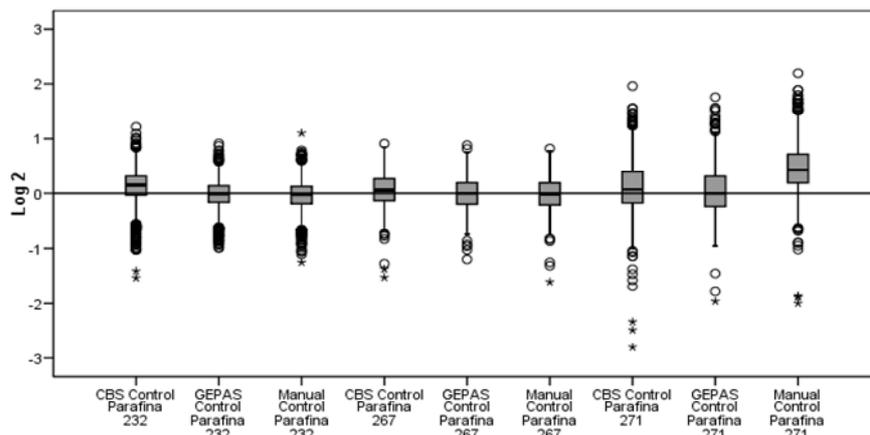


Figura 25. Boxplot resultante de la normalización de los controles extraídos ganglio incluido en parafina hibridados en el array. Cada una de las cajas del boxplot corresponde a un control normalizado con un método de análisis. Las tres primeras cajas pertenecen al mismo control normalizado por el método CBS, GEPAS y Manual, las tres cajas siguientes al segundo control normalizado por el método CBS, GEPAS y Manual, y así sucesivamente.

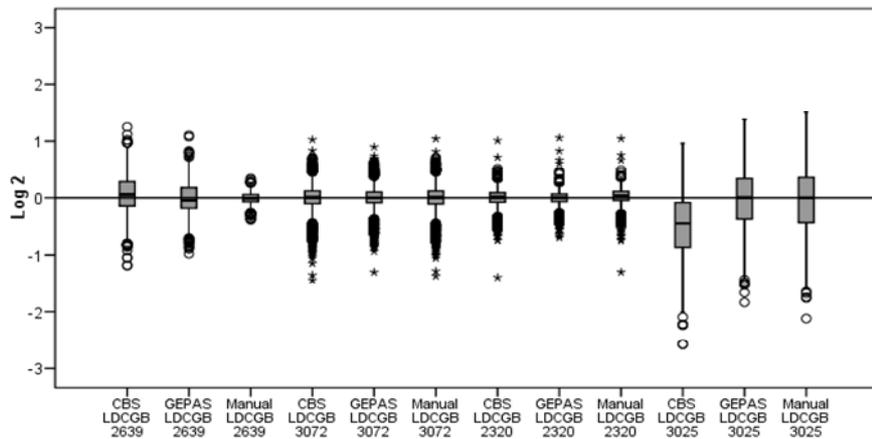


Figura 26. Boxplot de los LDCGB seleccionados para determinar el método de normalización. Cada una de las cajas del boxplot corresponde a un LDCGB normalizado con un método de análisis. Las tres primeras cajas pertenecen al mismo LDCGB normalizado por los métodos CBS, GEPAS y Manual; las tres cajas siguientes al segundo LDCGB normalizado por CBS, GEPAS y Manual, y así sucesivamente.

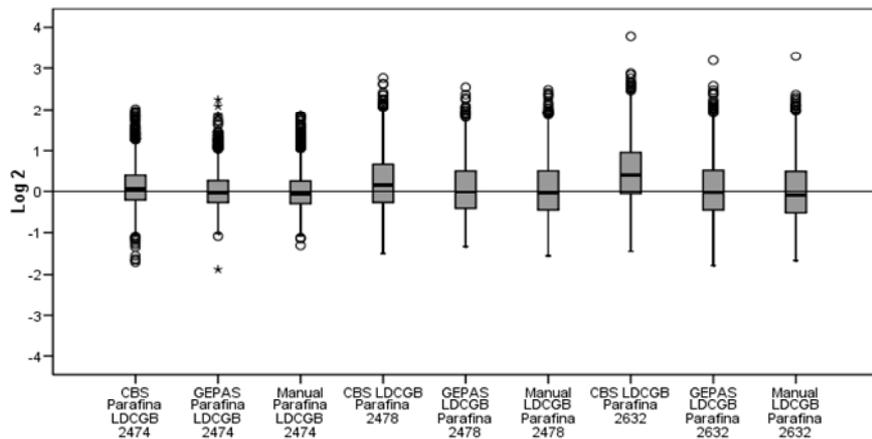


Figura 27. Boxplot de los LDCGB extraídos de ganglios incluidos en parafina. Cada una de las cajas del boxplot corresponde a un LDCGB normalizado con un método de análisis. Las tres primeras cajas pertenecen al mismo LDCGB normalizados por los métodos CBS, GEPAS y Manual; las tres cajas siguientes al segundo LDCGB normalizado CBS, GEPAS y Manual, y así sucesivamente.

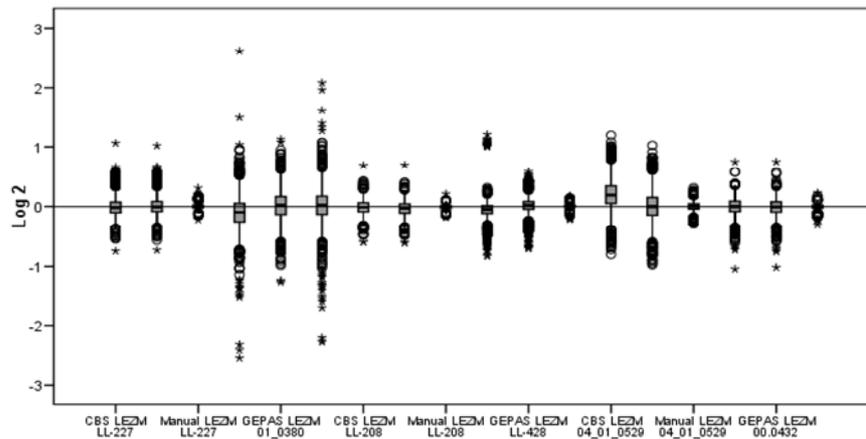


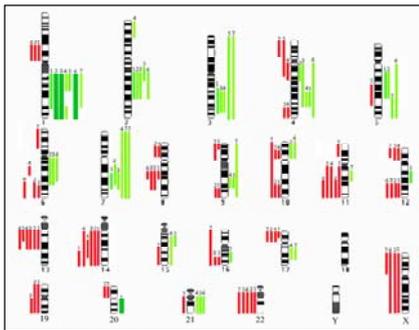
Figura 28. Boxplot de los LEZM. Cada una de las cajas del boxplot corresponde a un LEZM normalizado con un método de análisis. Las tres primeras cajas pertenecen al mismo LEZM normalizado por los tres métodos CBS, GEPAS y Manual; las tres cajas siguientes al segundo LEZM, y así sucesivamente.

11. Verificación del array y de la selección de las sondas

Para comprobar que el depósito de los clones sobre el array se estaba efectuando correctamente y que podían ser utilizados para las hibridaciones de las muestras tumorales, se realizó un array con 320 clones distribuidos de la siguiente manera: 99 clones de las placas SC13 1Mb BAC 1 y SC 13 1Mb BAC 2; 178 procedentes de las placas Cáncer 1, Cáncer 2, Cáncer 3, Cáncer 4; 2 clones del cromosoma X y otros dos que mapean en el cromosoma Y de la placa NONSC27 de la librería. Todos los clones fueron depositados por triplicado y distribuidos de manera aleatoria en el array. Como control negativo en este experimento se empleó el cósmido Cos1782 de *S. pombe*. Las muestras que se hibridaron sobre este primer array fueron ADN controles de individuos sanos (hombre/mujer) y ADN de líneas celulares de Mieloma Múltiple (MM). La metodología que se empleó tanto para la extracción, digestión y marcaje de los ADN como para la hibridación y los lavados posteriores se describe en el apartado de Material y Métodos (páginas 51-64). Las líneas celulares de MM empleadas para el análisis fueron MM1S, MM1R, U266, U266LR7, MM144, MGG Y NFR. Estas líneas celulares además fueron hibridadas por HGC

convencional para corroborar los resultados obtenidos por la metodología de los arrays genómicos. Por HGC convencional se detectaron ganancias en 7q; 2q, 3q, 4q y 1q y pérdidas en 13q, 14q, 11q, 22 y 8q. Además, esta metodología detectó amplificaciones que se localizaron en los cromosomas 1q y 20q (Figura 29).

A)



B)

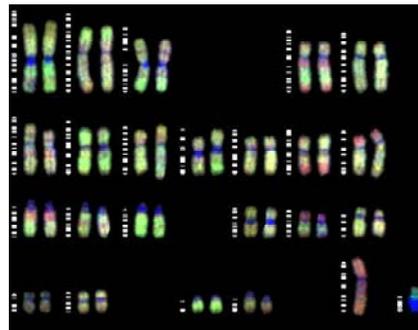


Figura 29. Resultados de HGC convencional. A) Idiograma del análisis de las líneas celulares de MM: a la izquierda de cada cromosoma se representan las pérdidas (líneas rojas) detectadas en las líneas celulares analizadas y a la derecha las ganancias (líneas verdes). Las líneas verdes más oscuras son las amplificaciones que la HGC convencional detecta en los cromosomas 1q y 20q. B) Cariotipo de la línea MM1S: El cariotipo muestra un rango de colores que va desde el rojo que significaría pérdida de la región cromosómica hasta el verde que sería ganancia de la región cromosómica. Los cromosomas que se tiñen de amarillo serían normales, es decir habría dos copias de ese material genómico en la línea celular analizada.

Los arrays genómicos identificaron como alteraciones más frecuentes en las líneas de MM analizadas ganancias a nivel de 1q25.3, 3q26, 17q21.1, 19p13.3, 20q11.21 y pérdidas en 4q34 y 16p13.3. La región cromosómica que se pudo analizar con más detalle mediante este array genómico de 320 clones fue el cromosoma 13, además de algunos oncogenes y genes supresores de tumores distribuidos a lo largo del genoma. El análisis detallado del cromosoma 13 mediante arrays genómicos permitió delimitar una región comúnmente delecionada, que incluía el gen *RB-1*, entre 13q12.11 (bA187L3) y 13q21.32 (bA10M21) (Figura 30).

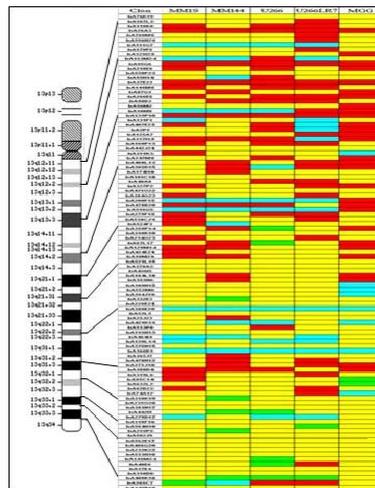


Figura 30. Análisis detallado del cromosoma 13q mediante arrays genómicos. La imagen muestra los cambios que se producen en 5 líneas celulares de Mieloma Múltiple. Los clones que estaban perdidos se representan en color rojo, las ganancias en verde, los que no mostraron cambios en amarillo, mientras que los que son no analizables aparecen en color azul.

Mediante HISF se comprobaron los resultados obtenidos en la región 13q14 que involucra al gen *RB-1* (Tabla 23).

Tabla 23. Análisis mediante HISF de la región específica del cromosoma 13q14 (gen *RB-1*).

Líneas Celulares MM	HISF Pérdida <i>RB</i>
MM1S	65 %
MM144	82 %
U266	81 %
U266LR7	84 %
MGG	85 %

Una vez que se hubo comprobado que el depósito de los clones sobre el array se estaba realizando de forma correcta se procedió a la preparación de un array más amplio, que contenía 986 clones: 99 procedían de las placas SC13 1MbSet BAC1 y SC13 1Mbset BAC2; 178 de las placas Cáncer 1, Cáncer 2, Cáncer 3, Cáncer 4; y 709 clones de las placas NONSC1, NONSC10, NONSC11, NONSC13, NONSC14, NONSC15, NONSC27, NONSC29 y NONSC35. Como control negativo se usó el cósmido Cos1782 de *S. pombe*. Sobre este nuevo array se realizaron 2 hibridaciones: en una de ellas se hibridaron dos ADN

de individuos sanos (hombre frente a mujer); y en la otra ADN de placenta marcado con los dos fluorocromos. En el análisis de este array, hombre frente a mujer, el único cambio aparecía en los clones pertenecientes a los cromosomas sexuales (Figura 31).

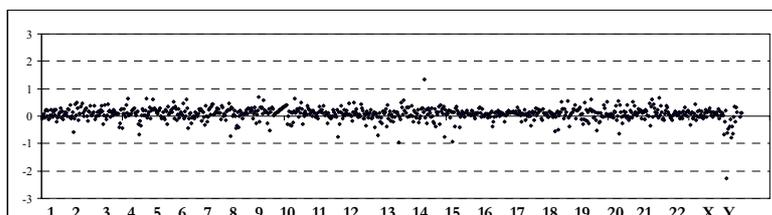


Figura 31. Representación gráfica del análisis de los 1.000 clones depositados sobre el array. En el eje de abcisas se representan los clones ordenados desde el cromosoma 1p hasta el cromosoma Y, y en el eje de ordenadas el valor del \log_2 de cada clon.

Dado que las hibridaciones de los controles eran correctas, se decidió ampliar el número de clones empleando toda la librería. Al final se obtuvieron un total de 3.523 clones depositados en el array. Para este array se amplió el número de controles negativos: además del clon de *S. pombe*, se incluyeron cinco clones de *D. melanogaster* de la genoteca CHORI-221, proporcionados por el “Children’s Hospital Oakland Research Institute” (CHORI) y puntos en los que no se había incluido ADN de clones sino que sólo era solución de depósito (DMSO al 50%).

De nuevo, el primer paso que se realizó fueron las hibridaciones de los controles, bien de hombre frente a mujer o de placenta frente a placenta. Se hibridaron un total de 29 controles sobre el array de 3.523 sondas. De ellos 9 fueron hombre frente a mujer, 17 fueron placenta frente a placenta y 3 muestras fueron hibridaciones con los ADN extraídos de ganglios de individuos sanos incluidos en parafina. Mediante un análisis visual de las hibridaciones se comprobó que no se había producido señal en los controles negativos de *D. melanogaster*, *S. pombe* y en los puntos en los que sólo se había depositado DMSO al 50% (solución de depósito) (Figura 32). Por el contrario, en los controles positivos existía un gradiente en la señal de hibridación.

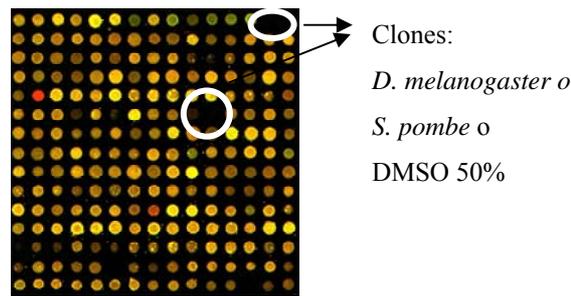


Figura 32. Imagen de un cuadrante del chip hibridado con muestra control. En los puntos incluidos dentro del círculo no se ha producido hibridación porque en ese lugar se ha depositado el ADN de un control negativo de la hibridación, *D. melanogaster* o *S. pombe*.

La relación de todos los clones incluidos en el array se puede observar con detalle en el Apéndice Anexo II. También, se puede encontrar información acerca del nombre internacional de los clones, su localización cromosómica dentro del genoma humano, la posición en la que comienza y termina el clon, en pares de bases, en el cromosoma y la placa de la librería a la que pertenecen.

Además de comprobar que el depósito de los clones en el array se estaba realizando correctamente otro objetivo de las hibridaciones de los controles fue eliminar aquellos clones que tras el análisis tuvieran un resultado incoherente. Como resultado de estas hibridaciones se detectó que aproximadamente el 1% de los clones incluidos en el array tenían homología con otras regiones del genoma debido a que su resultado era discordante con los clones flanqueantes. La HISF sobre metafases normales confirmó que estos clones hibridaban en múltiples regiones y fueron eliminados del array (p. ej.: bA28I21, bA12J5, bA13H10).

La identificación de los polimorfismos es un paso esencial para la correcta interpretación de los datos obtenidos tras la hibridación de los arrays. Los polimorfismos pueden ser identificados en los arrays como los clones cuyo valor de la intensidad del ratio se encuentran repetidamente y en experimentos independientes fuera de los umbrales que definen la normalidad. Se puede asumir que esos clones son polimórficos si los valores anormales se obtienen en un número representativo de experimentos separados usando ADN

de individuos sin un fenotipo clínico obvio o en diferentes experimentos con ADN de individuos con diferentes fenotipos clínicos.²¹⁷ Mediante el análisis de los controles se han eliminado los clones cuyo valor del \log_2 del ratio se encuentra fuera del valor umbral en más de la mitad de los controles analizados, además de los clones en los que en la base de datos DECHIPER (<https://dechiper.sanger.ac.uk/>) y en la de las variaciones genómicas (<http://projects.tcag.ca/variation/>) aparecen como CNV (“copy number variation”). La base de datos de las variaciones genómicas es un catálogo de cambios estructurales conocidos detectados en individuos sanos descritos en la literatura y el DECHIPER es una base de datos de cambios cromosómicos enumerados junto con los fenotipos asociados y las referencias apropiadas.

La relación de los clones eliminados del análisis se muestra en la Tabla 24.

Tabla 24. Clones eliminados del análisis de los BAC-arrays.

Nombre internacional	Placa	Pocillo	Banda	Genes conocidos
RP11-45I3	SC1_BAC1-1Mb	A5	1p36.13	NBPF1, NBPF10
RP11-415M14	SC1_BAC1-1Mb	G11	1q25.1-1q25.2	RFWD2
RP11-89C12	NONSC5	B2	2p12	
RP11-32C20	NONSC3	C7	2q21.1	RAB6C, A26C1B
RP11-463B12	NONSC14	A6	2q37.3	LOC643905, OR6B3, NDUFA10, MYEOV2, OR6B2, OTOS
RP11-169N13	NONSC7	F1	3q13.33	NR1I2, GSK3B, C3orf15
RP11-89E16	NONSC5	B4	3q23	CLSTN2
RP11-362A9	NONSC11/41	H4/E7	3q25.2	MBNL1
RP11-109F18	NONSC5	H6	4q25	PAPSS1
RP11-94E2	NONSC5	D8	5p15.1	
RP11-551B22	NONSC16	A2	5q13.2	LOC728340, DKFZP686M0199, LOC730394
RP11-567A12	NONSC29	F11	5q23.1	
RP11-121A8	NONSC6	C8	7p14.1	TARP, STARD3NL
RP11-490C5	SC9BAC-1Mbset_2	A3	9p22.3	C9orf52
RP11-65B23	Cancer_1	B2	9q21.33	CTSL1, DAPK1, CTSL3
RP11-153P4	SC9BAC-1Mbset_1	D10	9q34.2	SARDH, VAV2
RP11-13E1	SC10BAC-1Mbset_1	A3	10q11.22	FRMPD2
RP11-206L19	NONSC8	C7	11p15.3	USP47
RP5-859D17	NONSC24	G3	11p14.1	
RP11-424O11	NONSC13	C9	11q13.1	FLRT1, MACROD1, STIP1
RP11-7H7	NONSC1	E4	11q14.1	ODZ4
RP11-16K5	NONSC2	B10	11q21	MAML2
RP11-179B7	NONSC7	G8	11q22.3	
RP11-543P15	NONSC15	G11	12p13.33	TSPAN9
RP11-96P3	NONSC5	E2	12q13.13	KRT6B, KRT84, KRT6A, KRT85, KRT75, KRT6C, KRT82
RP11-183H16	NONSC7	H5	12q13.2	PAN2, SLC39A5, TIMELESS, RNF41, GLS2, MIP, OBFC2B, STAT2, COQ10A, IL23A, SMARCC2, APOF, SPRYD4, ANKRD52, MYL6, CS, CNPY2
RP11-12K13	NONSC1	H9	12q21.31	
RP11-114N19	NONSC27	G10	14q31.1	TSHR
RP11-365N19	NONSC28	H3	14q32.32	AMN, CDC42BPB, TRAF3
RP11-38E12	NONSC3	E3	15q13.3	
RP11-2C24	NONSC1	B2	16p11.2	PHKG2, SRCAP, FBRS, RNF40, LOC90835, ZNF629, PRR14
RP11-89H15	NONSC5	B7	17q23.3	ERN1, TEX2
RP11-115N5	NONSC27	H2	17q24.1	CCDC46
RP11-478P5	NONSC14	C7	17q25.1	LOC388419, KIF19, DNAI2, GPR142
RP11-268O21	NONSC9	F6	19p13.3	TLE2, GNA15, AES, TLE6, GNA11
RP11-521I20	NONSC29	E4	19q13.33	RCN3, RPS11, PRR12, SLC17A7, FCGR2, RPL13A, NOSIP, FLJ32658, PRRG2, DKKL1, CD37, ALDH16A1, PIH1D1, TEAD2, FLT3LG, PTH2
RP4-715N11	SC20PAC-1Mb_set	B3	20q13.2	
RP11-50L23	SC22_0.75_BAC	A3	22q11.22	
RP6-27C10	SCX_1Mb_PAC1	A4	Xp21.3	IL1RAPL1
RP11-217H19	SCX_1Mb_BAC1	A11	Xq21.1	
RP11-156J23	SCX_1Mb_BAC1	A7	Xq21.32	
RP1-75H8	SCX_1Mb_PAC1	B1	Xq22.3	CLDN2, MORC4

De los 3.523 clones que se depositaron inicialmente en el array y después del análisis en el que se han eliminado aquellos clones que tenían una DS > 0,3, o que estaban alterados debido a la presencia de polimorfismos poblacionales en la región donde mapean los clones, o que por HISF hibridaron en dos regiones diferentes del genoma, resultaron ser analizables 3.122. Estos clones analizables mapean desde la región más telomérica del brazo corto del

cromosoma 1 hasta el fragmento más telomérico del brazo largo del cromosoma 22, además de los 150 clones pertenecientes al cromosoma X y los 24 clones del cromosoma Y. En la hibridación de ADN de hombre frente al ADN de mujer del array en el que sólo se han analizado los 3.122 clones, el único cambio que se producía aparecía en los clones pertenecientes a los cromosomas sexuales (Figura 33).

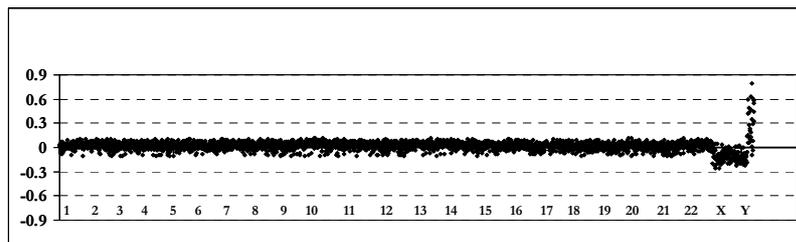


Figura 33. Clones incluidos en el array genómico ordenados desde el cromosoma 1 hasta el cromosoma Y. En el eje de ordenadas se representa el valor del \log_2 de los clones y en el eje de abscisas la posición de cada clon en el genoma desde el cromosoma 1p hasta el cromosoma Y.

Por tanto para los sucesivos análisis se eliminaron los clones que cumplieran alguna de las siguientes condiciones:

1. Los puntos ausentes en la colocación de la malla con el GenePix Pro 4.0.
2. Aquellos clones a los que la base *Ensembl* adjudicaba dos o más localizaciones cromosómicas.
3. Los puntos en los que la intensidad de la señal era más baja que la intensidad del ruido de fondo.
4. Los clones en los que se habían eliminado dos de las tres réplicas.
5. Los clones que aparecían en dos placas de la librería *1Mb clone set*. En el Apéndice 1 Anexo III se describen los clones que aparecen en dos de las placas de la librería. De estos clones se seleccionan los que tenían mayor tamaño según *Ensembl*.

De los 3.523 clones incluidos en la librería fueron excluidos por alguna de las razones anteriormente descritas 232 (<10%).

12. Análisis estadístico

Tras la hibridación se generó una imagen que fue sometida a un proceso de digitalización, normalización y cuantificación. Tras este tratamiento se obtuvo una colección de datos con las intensidades correspondientes a cada clon incluido en el array. Finalmente se procedió al análisis de los datos, que en ocasiones es una tarea compleja, pues la ventaja de esta técnica es que permite obtener una enorme cantidad de información en un único experimento. Nuestro array, con 3.500 sondas depositadas por triplicado, producía en un único experimento 10.500 valores. Esta gran cantidad de información se convierte en un problema importante a la hora de analizar todos los datos manualmente. Por ello, es preciso realizar un análisis estadístico complejo para obtener resultados. Por esta misma razón, la ayuda de los sistemas informáticos es clave para el análisis de todos los datos por un lado, y evitar la subjetividad inherente del propio investigador, por el otro. La aplicación de la estadística es especialmente importante cuando el investigador no conoce de antemano algunas regiones cuya cuantificación varíe en el sistema analizado, es decir, controles que permitan determinar de manera objetiva cual es el valor a partir del que se va a considerar que existe un cambio en el material genómico. En esos casos, evitar la subjetividad a la hora de establecer este punto de corte es fundamental.²³⁴

En este trabajo doctoral para evitar la subjetividad se han realizado numerosas hibridaciones con diferentes tipos de ADN y en diferentes combinaciones:

1. ADN de individuos sanos frente a ADN de individuos sanos.
2. ADN de placenta frente a ADN de placenta.
3. ADN de individuos sanos frente al ADN de placenta.

4. ADN de tejido no tumoral incluido en parafina frente a ADN de tejido no tumoral incluido en parafina.

5. ADN de tejido no tumoral incluido en parafina frente a ADN de placenta.

Una vez que se han obtenido las imágenes resultantes de las hibridaciones de todos los controles, se han colocado las mallas, se han eliminado aquellos clones en los que a simple vista la hibridación no ha ido correctamente, por posibles burbujas o por falta de fluorescencia en ese punto, y se han normalizado, obteniéndose los valores del \log_2 de los ratios Cy3/Cy5 para los clones que no han sido excluidos, los análisis estadísticos se han realizado en Excel. Observando los resultados de las hibridaciones de los controles se decidió que para los posteriores análisis tanto de los LEZM como de los LDCGB los umbrales a partir de los cuales se consideraban ganancias o pérdidas de material genómico fueron delimitados por la mediana más/menos 3 veces la desviación estándar ($Me \pm 3 \cdot DS$) de los controles que se han descrito previamente. De esta manera para las muestras procedentes de tejido fresco no incluido en parafina el límite fue de +0,4 para las ganancias y de -0,4 para las pérdidas y para las muestras incluidas en bloques de parafina el umbral fue un poco más elevado delimitándose a +0,7 para las ganancias y -0,7 para las pérdidas. Este tipo de análisis estadístico ha sido empleado anteriormente para el estudio de las alteraciones genómicas en los diferentes tipos de tumores.^{43;46;98;114;235}

CAPÍTULO II: Significado biológico y pronóstico de los cambios genómicos analizados mediante arrays genómicos en los Linfomas Esplénicos de la Zona Marginal

1. INTRODUCCIÓN

Los linfomas esplénicos de la zona marginal han sido analizados en detalle mediante citogenética convencional, HSF e HGC convencional.^{119;125;146;147;149;151;156-158} Sin embargo, y a diferencia del resto de los LNH-B,^{43;47;236;237} apenas hay estudios que analicen las ganancias y pérdidas de material genómico mediante CGH-arrays,^{30;113;114} y que relacionen la presencia de estos cambios genéticos con las características clínicas de estos linfomas.¹¹⁴ El objetivo principal de este estudio fue analizar con una plataforma de arrays genómicos, que contiene 3.523 clones procedentes de BAC y PAC y cubre todo el genoma con una resolución de 1 Mb, un grupo de pacientes diagnosticados de LEZM.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Descripción de los pacientes

Se incluyeron 68 pacientes con LEZM al diagnóstico. La mediana de edad fue de 69 años (rango, 44-86 años) con un discreto predominio femenino (58%). Los pacientes se diagnosticaron de acuerdo con la Clasificación de la Organización Mundial de la Salud.¹⁴

La mediana de supervivencia global (SG) para la totalidad de los pacientes fue de 43 meses (rango, 3-173). En el último seguimiento en el 43% de los pacientes la enfermedad había progresado. El análisis de citogenética molecular se realizó a partir de muestras de bazo (n=44) y en aquellos casos de los que no se disponía de bazo el análisis se realizó a partir de muestra de sangre periférica (n=24).

2.2. Métodos

En el presente trabajo se ha utilizado la técnica de los arrays genómicos. Como metodología de confirmación de los resultados obtenidos por CGH-arrays se han utilizado la técnica HISF. Los detalles técnicos de ambas metodologías se han descrito en el capítulo correspondiente (capítulo Material y Métodos, páginas 51-73). En los estudios de HISF las sondas empleadas fueron los clones de los BAC: bA44M6 situado en la banda del cromosoma 7q22.1 (99873610 - 100038722 pb), bA333G13 en 7q22.1 (101175494 - 101390682 pb), bA36B6 localizado a nivel de 7q31.31 (130078078 - 130270796 pb) y bA371N6 en 7q33 (134684519 - 134842787 pb).

Para determinar la asociación entre las variables genómicas y las clínicas o biológicas con la progresión se empleó el test de Chi-cuadrado. Cuando el número de celdillas con un valor esperado de menos de cinco fue superior al 20% se usó el test exacto de Fisher. El análisis multivariante con las variables que resultaron ser significativas en el análisis univariante se realizó mediante el modelo de regresión logística. Todos los valores de “p” fueron de dos colas y con una significación estadística definida para un valor de $p < 0,05$. La evaluación estadística se realizó mediante el programa SPSS 15.0.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Descripción de los cambios genómicos detectados por BAC-arrays

En 57 de los 68 pacientes con LEZM (84%) se identificaron alteraciones cromosómicas mediante la técnica de arrays genómicos. La mediana de cambios fue de 4 (rango 0-12). Esta incidencia es más elevada que la descrita anteriormente por otros autores.^{113;147;151;156;157;238}

Las alteraciones más frecuentes entre los casos con cambios genómicos fueron ganancias en los cromosomas 4q22.1 (14/57; 25%), 1q21.3-q22 (12/57; 21%), 6q25.3, 20q13.33 (11/57; 19%), 3q28, 22q (10/57; 18%), 6p21.1, 11q12.2 (8/57; 14%) y pérdidas a nivel de 7q22.1 (28/57; 49%), 2q23.3-q24.1 (20/57; 35%), 17p13.3-p13.1 (18/57; 32%), 4q31.3-q32.1 (17/57; 30%), 7q22.2-q35 (16/57; 28%), 3p26.1 (14/57; 25%), 3q13.11 (13/57; 23%) y 18q12.1 (9/57; 16%) (Figura 34).

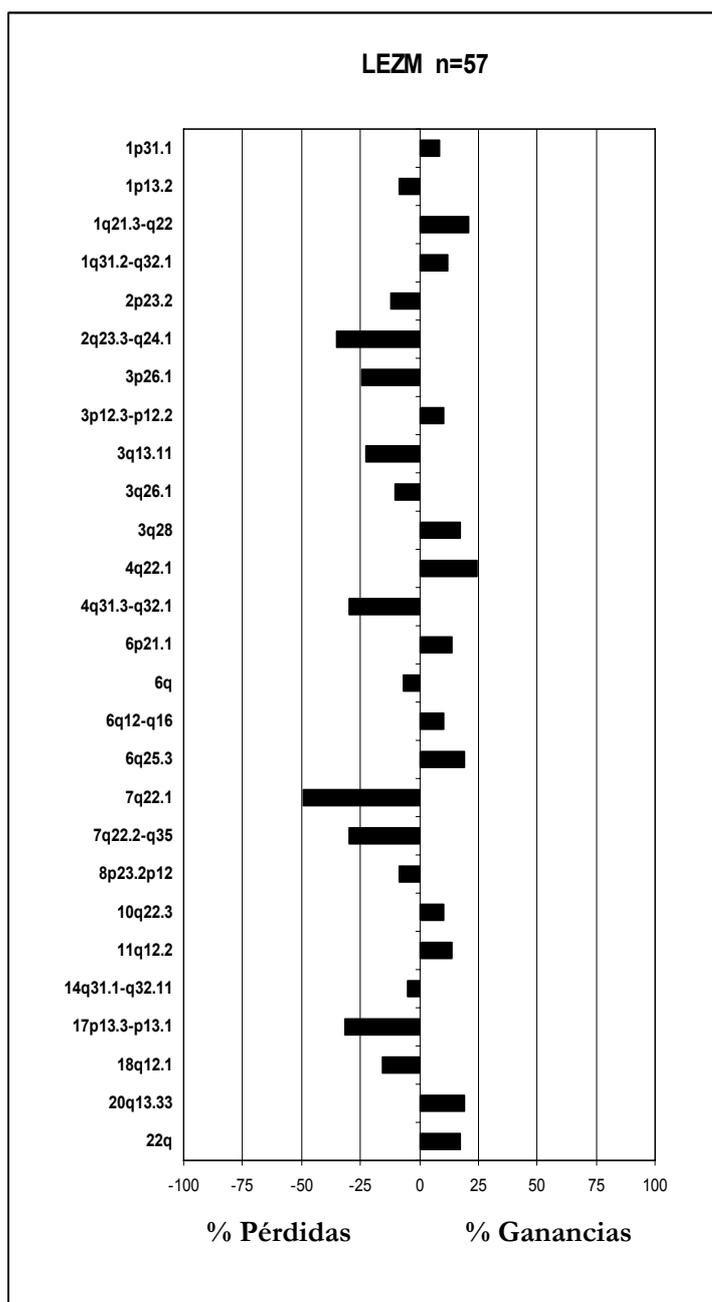


Figura 34. Representación de las alteraciones más frecuentes observadas en los LEZM analizados mediante arrays genómicos. Las barras que se encuentran al lado derecho del eje principal representan ganancias genómicas y las que están en el lado izquierdo representan pérdidas genómicas. Los resultados están expresados como porcentajes de casos con cambios genómicos del total de casos alterados.

Sólo tres casos mostraron pérdidas en el cromosoma 14q y solamente un caso tenía trisomía del cromosoma 12. Además, se delimitó un segmento crítico perdido en el

cromosoma 17p13.1, donde está localizado el gen *TP53*, en 18 de los 57 casos analizados (Figura 35).

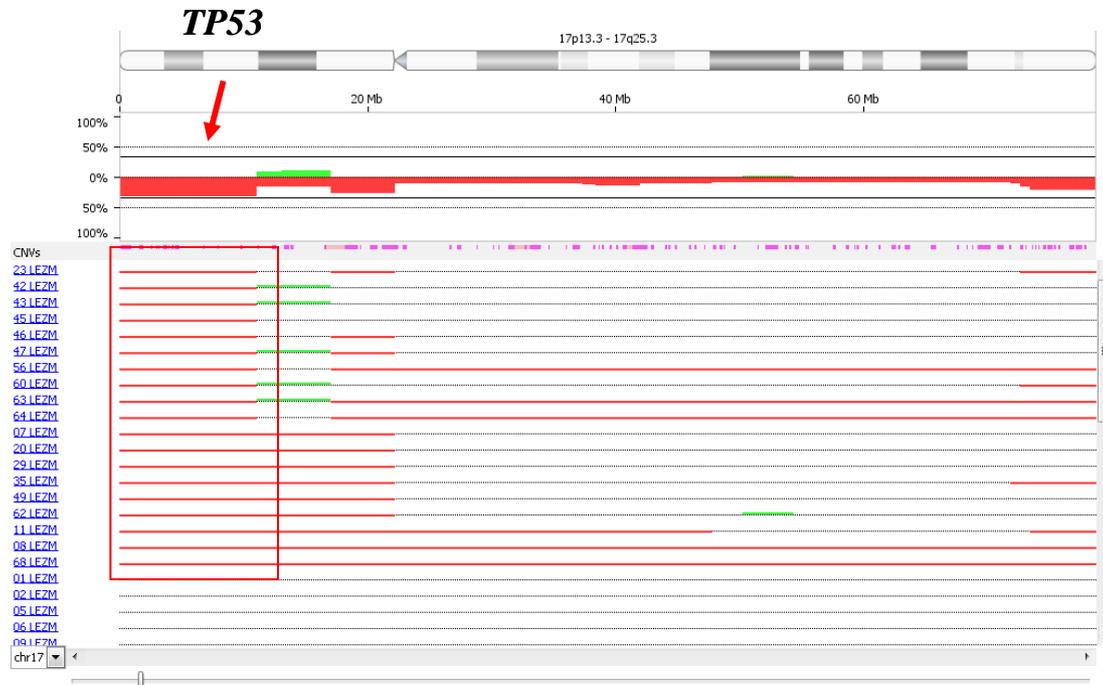


Figura 35. Análisis del cromosoma 17 en los LEZM. En la parte superior de la imagen están representadas las alteraciones (pérdidas en color rojo y ganancias en color verde) detectadas en el cromosoma 17. Cada una de las líneas de la parte inferior de la imagen representa las alteraciones observadas en ese cromosoma en cada uno de los LEZM. En todos los enfermos esta región contiene el gen *TP53*.

Algunos de los pacientes diagnosticados de LEZM se analizaron mediante el uso de dos plataformas de oligonucleótidos comerciales (Agilent 44K y NimbleGen 72K), con el fin de confirmar los resultados obtenidos por los BAC-array. Las tres metodologías de arrays empleadas en el estudio confirmaron alteraciones como las ganancias a nivel de los cromosomas 3, 6p22.1-p21.1, 8q, 17q, 18 y pérdidas en 4q28.3-q31.23, 10q24.33-q25.3 y 17p13.3-p13.1. Además, estos CGH-arrays pusieron de manifiesto la existencia de un paciente con trisomías en los cromosomas 3, 12 y 18 (Figura 36).

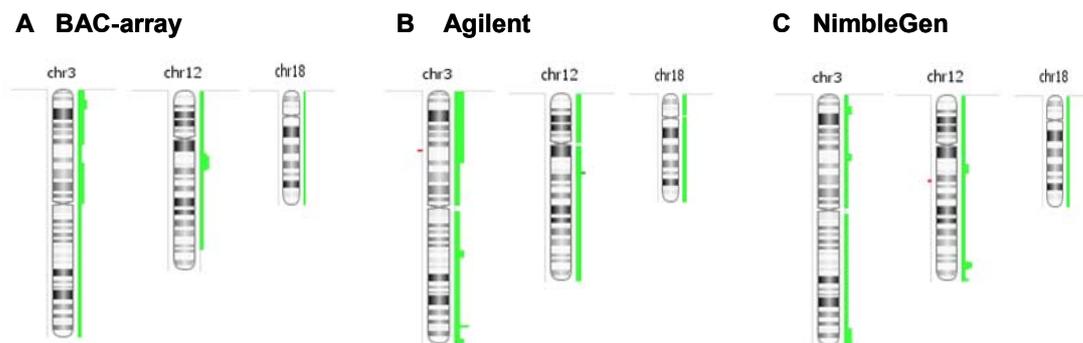


Figura 36. Comparativa entre las tres plataformas de arrays genómicos. En la figura se representan los cromosomas 3, 12 y 18. Junto a cada uno de los cromosomas las líneas verdes (derecha) muestran las ganancias y las rojas (izquierda) las pérdidas. A) Alteraciones detectadas por el BAC-array, B) Cambios genómicos observados por el array Agilent, y C) Alteraciones detectadas por el array NimbleGen.

Comparando estos resultados con los obtenidos por otros grupos en los que emplearon como metodología de análisis la HGC convencional, BAC-array y arrays de oligonucleótidos,^{30;113;114;147;157} observamos algunas alteraciones nuevas particularmente frecuentes como son las ganancias en 4q22.1 y 1q21.3-q22 y las pérdidas en 2q23.3, 4q31, 3p26, 3q13 y 18q12. Estas alteraciones no habían sido descritas con anterioridad en los LEZM lo que sugiere que hayan pasado inadvertidas debido a la baja resolución de la HGC convencional^{147;157} o al bajo número de casos analizados en los estudios con los CGH-arrays.^{30;113;114} Destaca la presencia de cambios cromosómicos en el cromosoma 4, que sin ser una alteración recurrente en los linfomas, es la alteración más frecuente observada en los LEZM en el presente estudio. Estas alteraciones han sido observadas mediante CGH-array en un grupo de linfomas periféricos inespecíficos de células T,²³⁹ pero no en linfomas B. Por el contrario, los arrays genómicos empleados en este estudio mostraron ganancias a nivel del cromosoma 3q en el 18% de los LEZM. Esta alteración es característica de varios tipos de LNH-B, como los LCM en los que aparece en la mitad de los casos^{45;108} y en los linfomas extranodales^{240;241} o en los LDCGB donde la frecuencia fue menor (24%).¹⁸⁰ La incidencia en este estudio de las ganancias en el cromosoma 3 es similar a los estudios en LEZM

previamente publicados realizados mediante SKY,¹⁵⁹ HIF,^{151;153;242-244} HGC convencional¹⁴⁷ y un poco más baja que la observada por CGH-arrays.¹¹⁴ Los estudios de HGC convencional en LEZM habían demostrado que las ganancias del cromosoma 3 ocurrían específicamente en el brazo q de este cromosoma. Por arrays genómicos la región queda más delimitada localizándose a nivel de 3q27.3-q28 con un tamaño de 3,82 Mb e involucrando a los genes *BCL-6*, *CLDNI*, *CLDN16*, *IL1RAP*, *UTS2D*, *CCDC50*, *FGF12*. La presencia de las ganancias en el cromosoma 3q en estudios anteriores, se ha asociado significativamente con una supervivencia inferior.^{147;245;246} Estos autores sugieren que el aumento de material genómico puede tener un efecto de dosis génica, donde los genes en la región ganada contribuyen de alguna manera a la transformación neoplásica o a la progresión de la enfermedad.²⁴⁶ El gen *BCL-6*, localizado en 3q27.3, es un represor transcripcional y diana de múltiples traslocaciones en los LNH.^{247;248}

3.2. Relación entre los cambios cromosómicos detectados mediante arrays genómicos y la progresión de los LEZM

Casi la mitad de los enfermos incluidos en el presente estudio (49%) presentaron una progresión del LEZM. La mediana de cambios genómicos observados por CGH-arrays en los pacientes que progresaron fue de 6,5 con un rango entre 1 y 10 alteraciones por paciente, mientras que en los que no presentaron progresión, la mediana de cambios fue de 3; rango 1-12.

La comparación de las alteraciones genéticas en los grupos de LEZM que progresaron o se mantuvieron estables se refleja en la Figura 37. Se observó que en los pacientes que no presentaron progresión la ganancia más frecuente estaba localizada a nivel de 1q21.31-q22 (5/25; 20%), mientras que las pérdidas afectaban a los cromosomas 7q22.1, 7q22.2-q35 (10/25; 40%), 2q23.3-q24.1 (8/25; 32%), 4q31.3-q32.1 (7/25; 28%), 3q13.11 (6/25; 24%) y 17p13.3-p13.1 (4/25; 16%). Por el contrario, en los pacientes que progresaron las ganancias

más frecuentes involucraban a 1q21.3-q22, 4q22.1, 6q25.3 (6/24; 25%), 6p21.1, 20q13.33 y 22q (5/24; 21%) mientras que las pérdidas se localizaban en 7q22.1 (13/24; 54%), 2q23.3-q24.1 (11/24; 46%), 4q31.3-q32.1, 17p13.3-p13.1 (*TP53*) (10/24; 42%), 3p26.1 (8/24; 33%), 18q12.1 (7/24; 29%), 3q13.11, 7q22.2-q35 (6/24; 25%) y 3q26.1 (5/24; 21%).

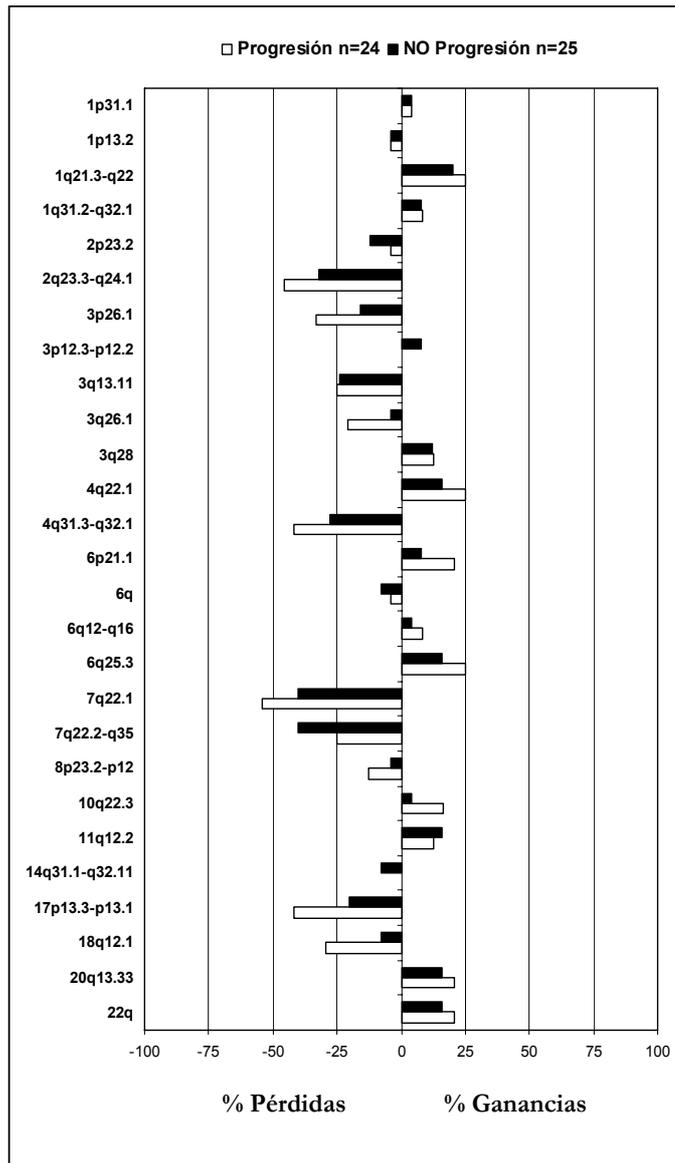


Figura 37. Resumen de las alteraciones genéticas observadas por CGH-arrays relacionadas con la progresión de los LEZM. La frecuencia de las ganancias (derecha) y de las pérdidas (izquierda) de los pacientes con progresión se muestra con las barras blancas mientras que las barras negras pertenecen a los pacientes sin progresión de la enfermedad.

En este estudio comparativo destaca la presencia de dos regiones de pérdida que se observaron con mayor frecuencia en los LEZM que progresaron: 17p13 y 18q12. En esta última región está localizado el gen *DSC3* que es un miembro de la superfamilia de las cadherinas, moléculas de adhesión dependientes de calcio. Estudios funcionales han identificado a *DSC3* como un potencial supresor tumoral y su pérdida podría estar relacionada con un evento temprano en la progresión tumoral.^{249,250} En el presente estudio se observó que LEZM con pérdidas en el cromosoma 18q12.1 tienden a estar asociados con una mayor progresión de la enfermedad ($p=0.074$; 7 pacientes con progresión frente a 2 pacientes que no progresan). Esta relación no es estadísticamente significativa probablemente debido al bajo número de pacientes en los que se ha podido detectar la delección, pero debería analizarse en estudios más amplios.

Todas las variables clínicas y genómicas incluidas en el estudio se analizaron en relación con la progresión de la enfermedad. En el análisis univariante se observó que la edad (pacientes menores de 70 años) ($p=0.015$) y las pérdidas de la región 17p13.1 (gen *TP53*) ($p=0.047$) se asociaban con la progresión de los LEZM. Estas variables fueron incluidas en el análisis multivariante y de nuevo las delecciones en el cromosoma 17p13.1 y la edad estaban relacionadas con la progresión de la enfermedad ($p=0.001$). En la mayoría de los LNH de línea B así como en la LLC-B la alteración más frecuente asociada con una menor supervivencia, progresión a la enfermedad, mayor riesgo de recaída o resistencia a fármacos es la pérdida en el cromosoma 17p, normalmente en el gen *TP53*.^{35;42;43;251;252} En los LEZM se había descrito la pérdida o la mutación de este gen como el único factor con un pronóstico adverso, por lo que nuestros resultados confirman el significado adverso, e independiente, de esta alteración genética en los LEZM.^{30;151;253}

3.3. Análisis de las pérdidas de 7q en los LEZM

3.3.1. Estudio por HISF

Con el fin de confirmar las alteraciones cromosómicas observadas mediante los arrays genómicos se llevaron a cabo estudios de HISF en un total de 20 pacientes diagnosticados de LEZM. En todos los casos el análisis mediante HISF confirmó los resultados obtenidos por CGH-array. El único criterio de selección de los pacientes estaba basado en la disponibilidad de la muestra (bloques de parafina de secciones de bazo). Mediante HISF se analizaron en 8 pacientes la región comúnmente delecionada a nivel de 7q22.1. En tres de ellos mostró pérdida en esa región mediante CGH-array y la HISF también mostró pérdidas en la región analizada, mientras que los otros cinco pacientes analizados no mostraron cambios genómicos por CGH-arrays y los estudios de HISF los mostraron como normales. Los estudios de HISF en la región 7q33.1 fueron realizados en 4 casos: dos de ellos mostraron deleciones mediante CGH-array y los estudios de HISF confirmaron la presencia de una sola señal de hibridación (Figura 38). Los dos pacientes restantes no mostraron alteraciones en la región de 7q33.1 por ninguna de las dos técnicas empleadas, CGH-array ni HISF.

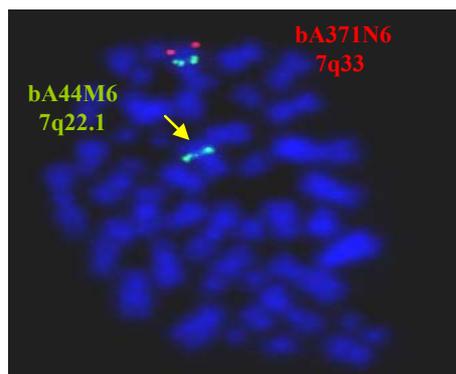


Figura 38. Análisis de HISF en metafase de un paciente con LEZM y pérdida de 7q33. La hibridación con la sonda bA371N6 marcada en rojo (7q33) y bA44M6 marcada en verde (7q22) revela una deleción a nivel del cromosoma 7q33 en este enfermo, mientras que la región 7q22 se conserva.

3.3.2. Análisis de alta resolución de las pérdidas en 7q en los LEZM

Tanto los arrays genómicos con ADN de BACs como los que tienen oligonucleótidos como sondas diana de hibridación mostraron deleciones en el brazo largo del cromosoma 7. Estas deleciones encontradas en los LEZM analizados fueron confirmadas y analizadas en mayor profundidad mediante el uso de un array específico de alta resolución para este cromosoma, mediante el que se analizaron cuatro enfermos con LEZM. Tres de ellos habían presentado pérdidas en 7q22.1 con los arrays de oligonucleótidos y con el BAC-array, mientras que el caso restante se usó como control, ya que no tenía pérdidas en 7q22.1. En el análisis se confirmó que los 3 casos que tenían pérdidas en 7q22.1, también las presentaban con el array de alta densidad (Figura 39). En esta región mucho más definida del cromosoma 7 están localizados los genes *MUC3*, *MUC12*, *SH2B2* y *CUX1*.

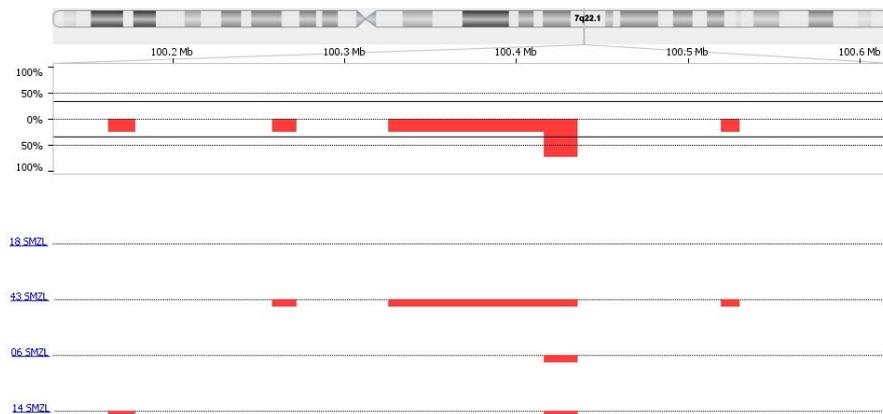


Figura 39. Análisis del cromosoma 7 mediante un array específico de alta resolución del cromosoma 7. La imagen muestra la deleción de la región de 7q22.1 en tres de los cuatro casos analizados. Por el contrario, el enfermo que no tenía esta pérdida mediante los arrays de oligonucleótidos y BAC-arrays, tampoco presentaba pérdidas con el array de alta densidad.

Cabe destacar que existe una diferencia de resolución entre las tres metodologías, BAC-array, NimbleGen 72K y array de alta densidad, específico del cromosoma 7, con las que se ha detectado la alteración a nivel de 7q22.1. Como se puede apreciar en la Figura 40, con el array específico del cromosoma 7 la región queda mucho más mapeada debido a que

el número de oligonucleótidos que detectamos para esa región, 7q22.1, es mucho mayor que con los otros arrays, 3.553 oligonucleótidos frente a los 53 del NimbleGen 72K o los tres clones del BAC-array. Por lo tanto con el análisis del array de alta densidad se puede detectar con mayor precisión la localización exacta de la delección que se produce en la banda del cromosoma 7q22.1.

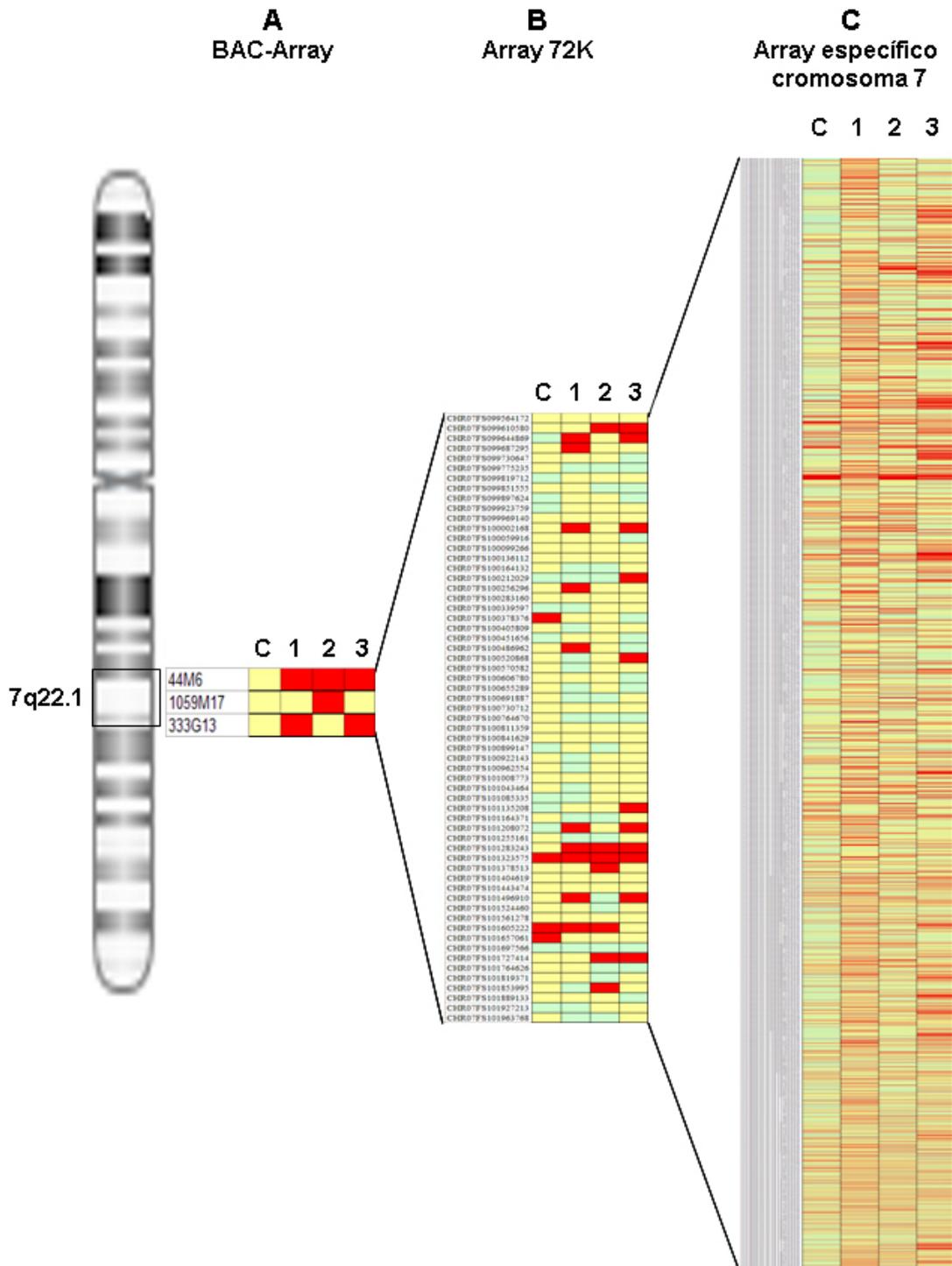


Figura 40. Cartografía detallada de la zona comúnmente deletcionada de la región 7q22.1. La figura 40 A muestra los tres clones que cubren esa región en el BAC-array, la figura 40 B los 53 oligonucleótidos que corresponden a esa región en el array 72K (NimbleGen) y la parte C de la figura es la región 7q22.1 cubierta por 3.553 oligonucleótidos en el array específico del cromosoma 7. Se observa que la pérdida de 7q22.1 se mantiene en los tres enfermos con LEZM.

Los arrays genómicos han puesto de manifiesto la pérdida del brazo largo del cromosoma 7 como una de las alteraciones más frecuentes en los LEZM (67%). Las pérdidas en 7q son muy poco frecuentes en otros tipos de LNH^{26;241;254;255} incluidos los linfomas de la zona marginal.²³⁸ Por ello, esta anomalía es considerada como un marcador genético característico de los LEZM^{114;144;151-153;256} y además se ha asociado con un curso clínico más agresivo de la enfermedad.¹⁵⁹ Varios estudios han confirmado que las alteraciones más comunes que involucran a 7q en los LEZM son las pérdidas en el brazo largo de este cromosoma, más que la presencia de traslocaciones,^{30;113;143;146-148;151-154;157;253} aunque se ha observado que en casos excepcionales de LEZM, la afectación de 7q21 puede involucrar al gen *CDK6*, gen con propiedades oncogénicas, cuya yuxtaposición con los promotores de los genes de las inmunoglobulinas podría estar implicada en la patogénesis de un pequeño grupo de LEZM con traslocaciones de 7q21.^{151;159;257} Sin embargo, la pérdida parcial de material genómico en 7q es más frecuente que las traslocaciones en 7q21. Los arrays genómicos confirmaron la pérdida de material genético en el cromosoma 7 y además pusieron de manifiesto la existencia de dos zonas delecionadas en el brazo largo del cromosoma 7: 7q22.1 (49%) y 7q22.2-q35 (30%). La región perdida en 7q32 tiene una alta densidad de MicroRNAs, que son reguladores de la expresión génica y además contribuyen en la oncogénesis, como supresores de tumores o como oncogenes.²⁵⁸ Tanto en los LEZM que muestran pérdida de 7q mediante LOH como en los que son normales, los MicroRNAs (hsa-mir-29a y hsa-mir-29b-1) localizados a nivel de 7q32 tienen una baja expresión. Estos microRNAs regulan la expresión de genes como *TCL1*.²⁸ Los resultados obtenidos en el presente estudio confirmaron la pérdida parcial del cromosoma 7 como el cambio más frecuente en los LEZM. Además, pusieron de manifiesto la existencia de otra nueva región comúnmente delecionada situada a nivel de 7q22.1 (49%) (Figura 41). Esta región tiene un tamaño de 1,51 Mb y se sitúa más centromérica a la que ya había sido descrita con anterioridad localizada a nivel de 7q22.2-q35 y con un tamaño de 43,15 Mb.



Figura 41. Análisis del cromosoma 7 mediante BAC-array de 57 LEZM. En la imagen se representan las pérdidas (líneas en rojo) y las ganancias (verde) en las distintas regiones genómicas del cromosoma 7. Cabe destacar que la mayoría de los enfermos analizados presentaban pérdidas genómicas a nivel de 7q22.1 (posición 100 Mb dentro del cromosoma 7).

La región de 7q22.1 se delimita entre los clones bA44M6 y bA333G13 y contiene a genes como *TSC22D4*, *HRBL*, *LRCH4*, *MUC3*, *MUC12*, *SH2B2*, *MUC17* y *CUX1*. Además, mediante el uso de arrays de alta resolución pudimos delimitar con más detalle esta región a la contenida entre los segmentos 99925039-101348479. Esta región contiene varios genes candidatos: *CUX1*, *SH2B2*, *MUC3* y *MUC12*. Los genes *MUC3* y *MUC12* forman parte de la familia de las mucinas transmembrana. Estos genes están involucrados en la protección celular, modulan la adhesión y la señalización; pueden estar implicados en la regulación del crecimiento celular epitelial y su expresión aberrante podría estar asociada con varios tipos de cánceres.^{259;260} Estudios recientes demuestran que *CUX1* juega un gran papel en la tumorigenesis y en la progresión de varios tipos de tumores como son el melanoma,²⁶¹ el leiomioma uterino,²⁶² el cáncer de ovario epitelial,²⁶³ el virus del papiloma humano,^{264;265} además del cáncer de mama²⁶⁶⁻²⁶⁸ y el cáncer de páncreas.^{267;269} En los cánceres de mama y

de páncreas, se observó que un incremento en la expresión de *CUX1* estaba directamente relacionado con un aumento en el estadio del tumor. Además, en los pacientes con un tumor de alto grado observaron que la expresión de *CUX1* fue mucho más fuerte que en estadios iniciales y que estaba inversamente relacionada con la supervivencia libre de recaída y la supervivencia global. En el cáncer de páncreas, igualmente se detectaron un incremento en la expresión de *CUX1* en los estadios más avanzados. Por tanto, los aumentos en los niveles de RNA y de proteína indican que los niveles elevados en la expresión de *CUX1* pueden jugar un papel importante en mejorar la capacidad de invasión y de progresión de estos tipos de tumores, por lo que *CUX1* podría representar una nueva diana para el bloqueo de la invasión de los tumores y podría utilizarse como marcador pronóstico.²⁶⁷ Estudios de expresión en tumores primarios y en líneas celulares de cáncer sugirieron que el incremento de expresión de *CUX1* podrían contribuir al desarrollo del tumor y/o a la progresión proporcionando al tumor una ventaja proliferativa.²⁷⁰ Cabe destacar que los estudios de microarrays revelaron que *CUX1* era uno de los genes sobre-expresados en las células plasmáticas malignas procedentes del mieloma múltiple comparándolas con las células plasmáticas no malignas.²⁷¹ En LF transformados a LDCGB la trisomía del cromosoma 7 se identificó como un marcador de progresión del LF indolente a agresivo. La mínima región amplificada en este cromosoma involucraba al gene *CUX1*. Este gen regula la linfopoyesis normal de las células B y su alteración en ratón estaba relacionada con las anomalías linfoides.^{80;272} Por el contrario, en pacientes con enfermedad mieloide como los síndromes mielodisplásicos (SMD) o la leucemia mielomonocítica juvenil se observó que era frecuente la monosomía del cromosoma 7, con una pérdida de los genes de la región de 7q22 entre los que se encuentra *CUX1*, y sin embargo, los análisis mutacionales no revelaron mutaciones patológicas en ninguno de los casos analizados, por lo que es improbable que este gen tenga un papel importante en este tipo de neoplasias.²⁷³ Por tanto, son varios los tipos de cánceres en los que ha sido descrito que la expresión aberrante del gen *CUX1* podría estar relacionada

con su capacidad de invasión así como con la progresión del tumor, pero hasta la fecha los estudios realizados en los LEZM no han podido relacionar la expresión del gen *CUX1* con este tipo de neoplasia.

La segunda región que encontramos delecionada por CGH-array es la localizada a nivel de 7q22.2-q35 (30%), esta región incluye la región descrita previamente en otros estudios.^{30;113;114;146;147;152-154;157} Tiene un tamaño de 43,15 Mb y esta delimitada por los clones dJ672O11 y dJ558L10. Dentro de esta región encontramos genes como *RELN*, *LHFPL3*, *PBEF1*, *THAP5*, *IMMP2L*, *FOXP2*, *TES*, *MET*, *ST7*, *PTPRZ1*, *GRM8*, *UBE2H*, *MLKN1*, *BPGM*, *CALDI*, *PTN*, *SVOPL*, *AGK*, *KEL*, *TPK1* y *CNTNAP2*. El gen *MET* es un protooncogen y un importante regulador de la proliferación y diferenciación celular, regeneración de los órganos, embriogénesis y oncogénesis; podría ser uno de los oncogenes que controlan la progresión de los cánceres primarios hacia la metástasis. El gen *ST7* es un gen supresor tumoral y su expresión a proteína es inhibida en el LCM.²⁷⁴ Esta alteración cromosómica a nivel de 7q22.2-q35 se ha considerado como un marcador genético específico de los LEZM y está asociada con un curso clínico más agresivo de la enfermedad.¹⁵⁴ En nuestro estudio, la deleción en el brazo largo del cromosoma 7 no está significativamente asociado con la progresión de la enfermedad ($p=0.263$).

3.3.3. Cambios genómicos observados en los casos con pérdidas en 7q y en los casos sin alteraciones en 7q

En la última parte del estudio de los LEZM realizamos una comparación de las alteraciones genéticas presentes en los LEZM con pérdidas en 7q frente a los casos que no las presentaban. De los 57 pacientes con LEZM que mostraron alteraciones mediante CGH-array, 38 tenían pérdidas en 7q (67%) (Figura 42).

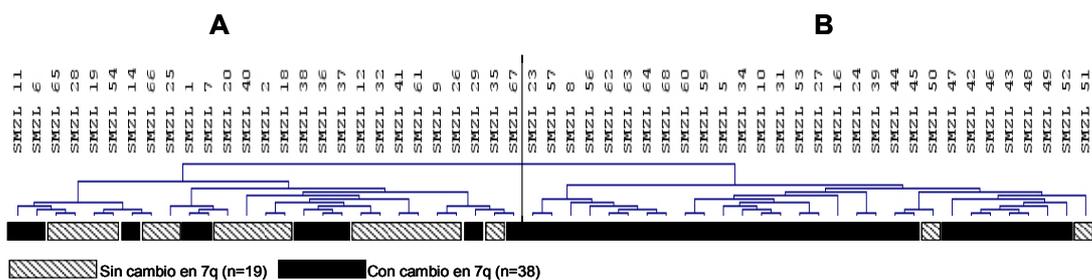


Figura 42. Cluster LEZM. Los 57 LEZM que muestran alteraciones por CGH-arrays se separan en dos ramas. En la rama A se localizan la gran mayoría de los LEZM que no mostraron cambios genómicos a nivel de 7q, mientras que en la rama B se encuentran los casos en los que se observaron alteraciones en esta región.

En estos pacientes la mediana de cambios fue de 4,5 (rango 1-12) y los cambios más frecuentes se recogen en la Figura 43. Se observaron ganancias en 4q22.1 (34%), 3q28 (24%), 1q31.2-q32.1 (18%), 6q12-q16 (16%), 1p31.1, 3p12.3-p12.2 (13%) y 1q21.3-q22, 6q25.3 (10%), mientras que las pérdidas afectaban a 17p13.1 (45%), 2q23.3-q24.1 (34%), 4q31.3-q32.1 (32%), 3p26.1 (26%), 18q12.1 (21%), 2p23.2 (18%) y 1p13.2, 3q26.1 (13%).

En los 19 pacientes que no mostraron alteraciones en el cromosoma 7q (33%) la mediana de cambios fue similar: 4 (rango 1-8) y las ganancias más frecuentes se localizaron a nivel de 1q21.3-q22, 20q13.33 (42%), 6q25.3, 22q (37%), 6p21.1, 11q12.2 (26%) y 10q22.3 (21%) mientras que las pérdidas en 2q23.3-q24.1 (37%), 4q31.3-q32.1 (26%), 3p26.1 (21%), 6q, 14q31.1-q32.11 (16%) y 8p23.2-p12 (10%) (Figura 43).

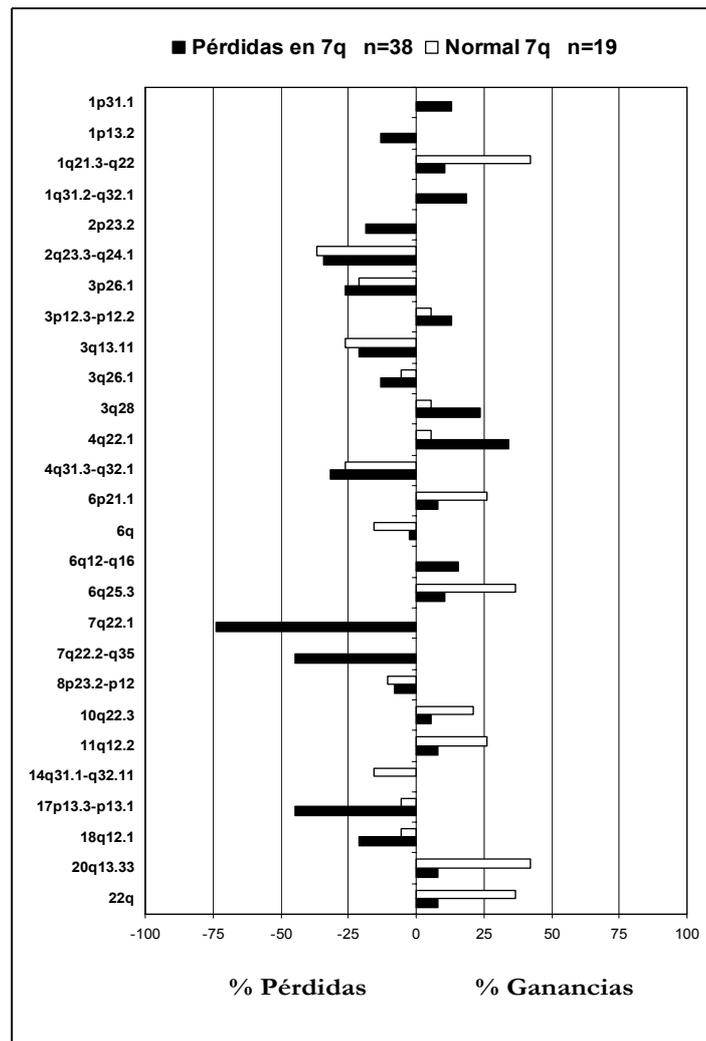


Figura 43. Principales regiones alteradas en los LEZM clasificados de acuerdo con la presencia de pérdidas en 7q. La frecuencia de las ganancias (derecha) y de las pérdidas (izquierda) de los pacientes con pérdidas en 7q se muestran con las barras negras mientras que las barras blancas representan las alteraciones de los pacientes que no tenían pérdidas en 7q.

Los estudios previos habían determinado que la delección del cromosoma 7 y la ganancia en 3q ocurrían raramente juntas en LEZM sugiriendo que en la patogénesis de estos linfomas podían estar implicadas dos rutas diferentes, una relacionada con la delección del cromosoma 7 y la otra con el aumento de material genómico del cromosoma 3.^{146;151} En nuestro estudio no se ha podido confirmar este hallazgo ya que 8 de los 38 pacientes que mostraron pérdidas en alguna de las dos regiones observadas del cromosoma 7, además

presentaron ganancias en 3q27.3-q28, lo que puede sugerir que la coexistencia de ambas alteraciones no es un evento infrecuente en los LEZM.¹⁴⁹ Las alteraciones en el cromosoma 17p13.1 (gen *TP53*) son más frecuentes en pacientes que mostraron pérdidas en el cromosoma 7q. Estos cambios se han descrito previamente pero raramente se han asociado con pacientes que presentaban o no alteraciones en el cromosoma 7¹¹⁴ y podrían justificar el peor pronóstico observado en los enfermos con LEZM y pérdidas en 7q.¹¹³

Por el contrario, encontramos ganancias en el cromosoma 20q13.33 en el 19% de los 57 LEZM analizados siendo estos cambios más frecuentes (42%) en los pacientes que no mostraron alteraciones en el cromosoma 7, así como ganancias en los cromosomas 1q21 y pérdidas en 6q y 14q32. Los cambios en el cromosoma 20 en los LEZM han sido descritos previamente en estudios realizados con HGC convencional con similares proporciones a las detectadas en nuestro estudio.¹⁴⁷ En esta región está localizado el gen *DIDO1*, que es un factor de transcripción, proapoptótico cuando está sobreexpresado y es un supresor tumoral en los síndromes mieloproliferativos. Sin embargo, su asociación con los LEZM no había sido referida previamente.²⁷⁵

En resumen, los arrays genómicos confirman las alteraciones previas descritas en los pacientes diagnosticados de LEZM y además ponen de manifiesto nuevas regiones comúnmente alteradas no detectadas hasta la fecha por otras metodologías de menor resolución.

CAPÍTULO III: Significado biológico de los cambios genómicos analizados mediante arrays genómicos en los Linfomas Difusos de Célula Grande B

1. INTRODUCCIÓN

Aproximadamente la mitad de los pacientes que son diagnosticados de linfomas no-Hodgkin agresivos de células B se curan con quimioterapia. Sin embargo, los pacientes con IPI alto tienen peor pronóstico por lo que se tratan con quimioterapia más agresiva y TPH.²⁷⁶ Recientemente, el grupo GELTAMO ha publicado los resultados relativos a 86 pacientes diagnosticados de LDCGB con mal pronóstico tratados con altas dosis de CHOP y seguido de IFE antes del TPH. Esta estrategia dio lugar a una supervivencia libre de progresión y a una supervivencia esperada del 56% y 64% respectivamente.²⁷⁷ Cabe reseñar que en este estudio, en el que sólo se incluyeron pacientes con mal pronóstico, el IPI no tenía valor pronóstico. Por lo tanto, es necesario encontrar nuevos predictores tales como los marcadores biológicos para poder identificar mejor el pronóstico de este grupo de pacientes. Por ello, en este estudio nos propusimos analizar si los cambios genómicos obtenidos mediante arrays genómicos en una serie de 40 pacientes incluidos en este estudio prospectivo del grupo GELTAMO pueden aportar información acerca del pronóstico de este grupo de enfermos. Nuestros resultados demuestran la existencia de una relación entre los cambios genómicos, la respuesta al tratamiento y la supervivencia de los pacientes.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Descripción de los pacientes

Se incluyeron 40 pacientes con LDCGB al diagnóstico. Los enfermos se diagnosticaron de acuerdo con la Clasificación de la OMS. Todos ellos recibieron 3 cursos

de MegaCHOP y se evaluó la respuesta mediante TAC y Galio⁶⁷Scan (Ga⁶⁷). Los 40 pacientes pertenecían a una serie de 86 casos incluidos en un ensayo clínico y el único criterio de selección fue la disponibilidad de la muestra para la realización de los estudios de arrays genómicos. No había diferencias en cuanto a las características clínicas, a la respuesta al tratamiento y a la supervivencia entre los pacientes incluidos en el estudio y el resto de los pacientes incluidos en el protocolo de tratamiento. La remisión completa (RC) se definió como la desaparición de todas las evidencias clínicas, radiológicas y analíticas de enfermedad durante al menos tres meses después del trasplante. Se consideró remisión completa incierta (RCi) para aquellos pacientes que reunían criterios de respuesta completa, pero que presentaban lesiones residuales en la TAC. La respuesta parcial (RP) se definió como la disminución en más del 50% de la suma de los productos de los dos diámetros mayores de cada una de las lesiones apreciables sin la aparición o el aumento de nuevas lesiones. El fallo al tratamiento (FT) se definió como la disminución en menos del 50% de las lesiones apreciables, o un incremento del 25% de la suma del diámetro de alguna lesión medible, o la aparición de nuevas lesiones independientemente de la respuesta en áreas primariamente afectadas. Además, en los criterios de respuesta se incluyó el estudio con Ga⁶⁷. De este modo se consideró RC cuando el Ga⁶⁷ fue negativo con RC o RP en el TAC, mientras que si el Ga⁶⁷ era positivo después de tres ciclos los pacientes se dividieron en dos grupos diferentes: pacientes con RP por TAC y pacientes con menos que RP en el TAC que fueron considerados como FT.²⁷⁷

Todos los pacientes incluidos en este protocolo estaban diagnosticados de linfoma agresivo con IPI > 1 o IPI = 1 y niveles altos de β -2 microglobulina (β -2m). Los linfomas transformados fueron excluidos del análisis. En todos los casos se realizó una revisión por dos anatomopatólogos que analizaron las biopsias de manera independiente. El protocolo de estudio fue aprobado por los comités éticos locales y se obtuvo un consentimiento informado y escrito de todos los enfermos. Las características de los pacientes se describen en la Tabla

25. La mayoría de los pacientes se encontraban en un estadio clínico avanzado, con síntomas B y niveles elevados de LDH; la mediana de seguimiento fue de 34 meses. Quince pacientes fallecieron durante el seguimiento. El análisis de citogenética molecular se realizó a partir de muestras de ganglio.

Tabla 25. Características clínicas de los pacientes diagnosticados de LDCGB analizados mediante arrays genómicos

Variable	Nº de pacientes
Edad	53 años (24-68) *
Sexo (H/M)	21/19
Estadio Ann Arbor III-IV	36 (90%)
Síntomas B	25 (63%)
Afectación extranodal ≥ 2	14 (35%)
Afectación MO	10 (25%)
Masa voluminosa	15 (38%)
ECOG > 1	21 (53%)
LDH elevada	33 (83%)
$\beta 2M$ elevada	19 (48%)

*mediana (rango)

H, hombre; M, mujer; MO, médula ósea; ECOG, estatus; LDH, lactato deshidrogenasa
 $\beta 2M$, $\beta 2$ microglobulina

2.2. Métodos

Para la realización del estudio se emplearon 40 ADN pertenecientes a los pacientes diagnosticados de LDCGB de los cuales 19 fueron extraídos de muestras procedentes de tejido fresco y 21 de muestras procedentes de tejido embebido en parafina. Los detalles técnicos de las metodologías de extracción de los ADN, de los CGH-arrays y de la HISF se describen en el capítulo correspondiente (capítulo Material y Métodos: páginas 51-64; 66-73).

Los estudios de HISF se realizaron con las sondas pertenecientes a las siguientes regiones: en 10q23.31 se seleccionaron los BACs RP11-165M8 y RP11-380G5 (que contiene el gen *PTEN*); en 17p13.1, donde se localiza el gen *TP53*, los BACs RP11-186B7 y

RP11-199F11; dos sondas para 2p16.1, que contienen los genes *BCL11A* y *c-REL*, RP11-440P5 y RP11-373L24; y para la región de 1q21 se utilizaron los BACs RP11-98D18 y RP11-172I6.

La relación entre las variables clínicas o biológicas y las características genéticas detectadas por arrays genómicos se analizó mediante el t-test para muestras independientes. La supervivencia global (SG) se calculó desde el inicio del tratamiento hasta el último seguimiento o la muerte. La supervivencia y la duración de la respuesta se analizaron mediante el método de Kaplan-Meier²⁷⁸ y el log-rank test.²⁷⁹ El análisis multivariante de las variables que resultaron ser significativas en el análisis univariante se realizó de acuerdo con el modelo de regresión lineal de Cox.²⁸⁰ Todos los valores estadísticos obtenidos se definieron como estadísticamente significativos con $p < 0,05$. La evaluación estadística se llevó a cabo utilizando el programa estadístico SPSS 15.0.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Descripción de los cambios genómicos detectados por CGH-array

En 38 de los 40 pacientes analizados (95%) se observaron ganancias o pérdidas de material genético mediante arrays genómicos. Había un total de 722 regiones alteradas (mediana de 5 cambios por paciente, rango de 0 a 75). Las ganancias cromosómicas fueron los cambios más frecuentemente detectados, localizándose a nivel de 11q23.3 (20/40; 50%), 3p21.1 (19/40; 48%), 6p21.1, 11q12-q13.1 (18/40; 45%), 12q13-q14.1 (17/40; 43%) y 1q21-q22 (16/40; 40%), mientras que las pérdidas eran menos frecuentes y afectaban a 5q21.1 (13/40; 33%), 8q23.1, 11q14.3 (10/40; 25%), y 3q13.31-q13.32 (9/40; 23%) (Figura 44). En la Tabla 26 se describen las alteraciones más frecuentes, el tamaño de las mismas y los genes localizados dentro de cada región alterada. En el brazo largo del cromosoma 10, se identificaron dos regiones comúnmente perdidas: 10q23.31 (4/40; 10%) y 10q25.1-q26.3

(6/40; 15%). La región delecionada localizada a nivel de 10q23.31 contiene el gen *PTEN*. En el cromosoma 17, a nivel de 17p13.1, donde se localiza el gen *TP53*, se observaron pérdidas en siete de los pacientes analizados (18%).

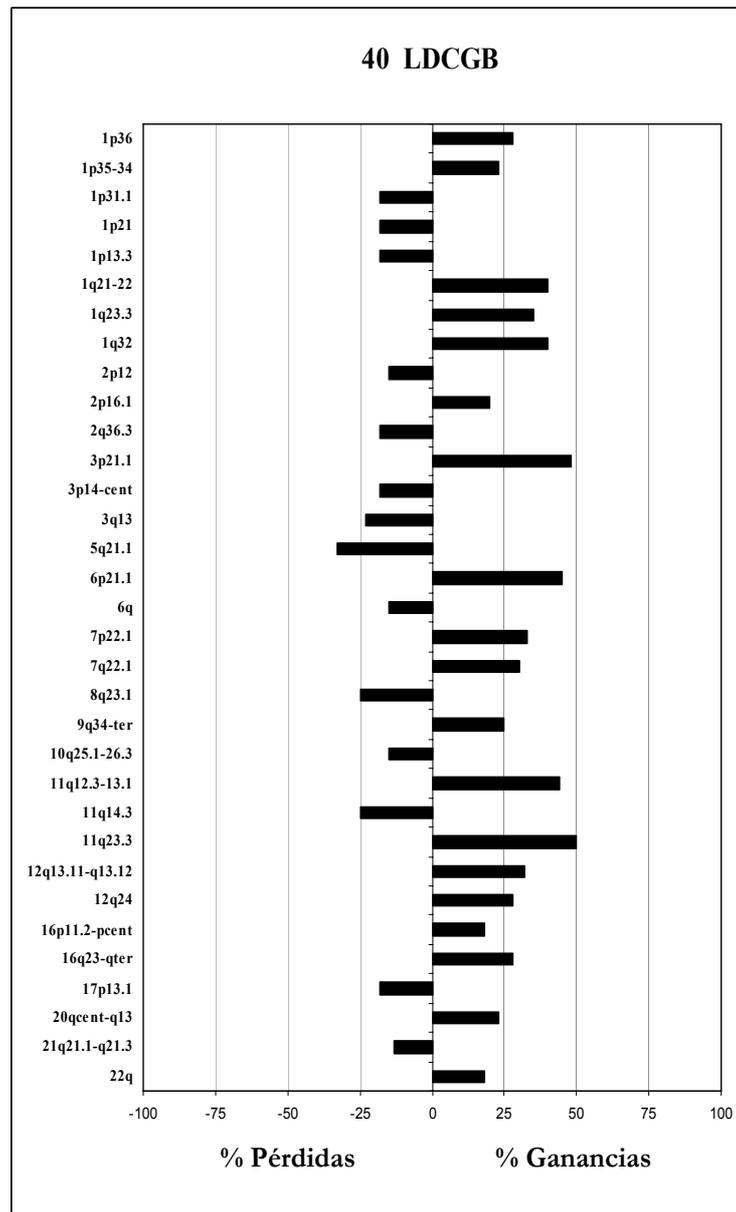


Figura 44. Regiones comunes de ganancias y pérdidas en los 40 pacientes con LDCGB. El árbol muestra las regiones genómicas con ganancias (derecha) o pérdidas (izquierda). A cada región le corresponde una localización citogenética y la frecuencia con la que está alterada dentro de la cohorte analizada.

Se confirmó que las regiones más frecuentemente afectadas en los enfermos con LDCGB fueron las ganancias en 11q23 (50%), 7p22 (33%), y 3p25 (15%) y las pérdidas en 1p31 (18%), 6q (15%), y 17p13.1 (18%).^{95;96} Por el contrario, en nuestro estudio se observaron más casos con pérdidas en 5q21 (33%), 8q23 y 11q14 (25%), así como un menor número de casos que mostraron ganancias en el cromosoma 18q (8%) y pérdidas en 9p21 (3%) que los descritos hasta ahora.^{95;96} Estas diferencias podrían estar relacionadas con las características de agresividad de la enfermedad de los pacientes incluidos en el estudio. Hasta la fecha, todos los estudios de arrays genómicos que se han realizado se han centrado en localizar genes diana y no en relacionar esas alteraciones con la clínica de los pacientes. Además, estas series no incluían pacientes que han sido prospectiva y homogéneamente tratados.^{95;96}

Tabla 26 A. Principales regiones con ganancias detectadas por arrays genómicos en los LDCGB y posibles genes implicados.

Región	Clon inicial/final (n° de clones) Tamaño	Ganancia %	Genes candidatos
1p36	dJ785P20/dJ669K10 (27 clones) 25,6 Mb	28%	FGR, AHDC1, GPR3, CD164L2, SLC9A1, RUNX3, IL28RA, GRHL3, AOF2, LUZP1, LDLRAD2, USP48, HSPG2, IGSF21, CROCC, MFAP2, SDHB, ATP13A2, PADI2, FHAD1, CLCN6, PLOD1, MTHFR, NPPA, VPS13D, PTCHD2, TARDBP, MASP2, SRM, EXOSC10, FRAP1, UBE4B, H6PD, PER3, VAMP3, CAMTA1, NPHP4, KCNAB2, AGRN, ISG15, PRDM16.
1p35-p34	bA84A19/dJ884C9 (9 clones) 6,4 Mb	23%	SPOCD1, BAI2, TMEM39B, KPNA6, RBBP4, ZBTB80S, SYNC1, YARS, CSMD2, STK40, LSM10, CSF3R, GRIK3, MTF1, POU3F1.
1q21-q22	dJ790G17/bA172I6 (8 clones) 5,97 Mb	40%	SLC27A3, INTS3, GATAD2B, NUP210L, LENEPI, FLAD1, CKS1B, ZBTB7B, DCST1, ADAM15, PMVK, PYGO2, DCST2, SHC1, TRIM46, MTX1, THBS3, MUC1, KRTPAP2, GBAP, GBA, SCAMP3, CLK2, HCN3, FDPS, RUSC1, ASH1L, PKLR, LMNA, RAB25, UBQLN4, ARHGEF2, SEMA4A.
1q23.3	bA137A12/bA5K23 (2 clones) 2 Mb	35%	NIT1, USP21, UFC1, PPOX, FCER1G, TOMM40L, PFDN2, DEDD, ADAMTS4, B4GALT3, APOA2, NR1B3.
1q32	bA469A15/bA534L20 (9 clones) 6,64 Mb	38%	ZNF281, LGR6, PPP1R12B, UBE2T, JARID1B, RABIF, KLHL12, PLEKHA6, PIK3C2B, PPP1R15B, MDM4, LRRN2, SRGAP2, IKBKE, RASSF5.
2p16.1	bA440P5/bA373L24 (2 clones) 0,63 Mb	20%	BCL11A, REL, PEX13.
3p21.1	bA447A217/dJ966M1 (2 clones) 0,28 Mb	48%	PBRM1, GNL3, SPCS1, GLT8D1, NEK4, ITIH1
6p21.1	bA162O6/bA227E22 (4 clones) 3,29 Mb	45%	BYSL, CCND3, TBN
7p22.1	bA172O13/dJ810E6 (3 clones) 0,51 Mb	33%	UB7I1_HUMAN
7q22.1	dJ550A13/bA44M6 (5 clones) 1,33 Mb	30%	ARPC1A, BUD31, CPSF4, PDAP1, ATP5J2, AZGP1, TSC22D4, HRBL, FBXO24, LRCH4
9q34-qter	bA153P4/bA83N9 (4 clones) 2,7 Mb	25%	SARDH, VAV2, MRPL41, PNPLA7, ARRCDC1
11q12.3-q13.1	bA286N22/bA399J13 (7 clones) 3,9 Mb	44%	DAK, DDB1, CYBASC3, CPSF7_HUMAN, SYT7, FADS1, TTC9C, GNG3, RPS6KA4, CCDC88, PRDX5, TM7SF2, SNX15, ZFPL1, ZNHIT2, CAPN1, SPDYC, CDCA5, FAU, SYVN1, CAPN1
11q23.3	bA35P15/bK3245B9 (2 clones) 1,3 Mb	50%	DSCAML1, DDX6, BLR1, BCL9L, UPK2, FOXR1, CCDC84, RPS25, TRAPPC4
12q13.11-q13.12	dJ1057I20/dJ405J10 (5 clones) 2,4 Mb	32%	VDR, COL2A1, CCDC65, WNT1, FKBP11, ARF3, PRKAG1, DDN, MLL2
12q24	bA144B2/bA158L12 (8 clones) 5,02 Mb	28%	PXN, NME2P1, SIRT4, DYNLL1, COQ5, RNF34, ANAPC5, BCL7A, GTF2H3, BRI3BP
16p11.2-pcent	bA74E23/bA274A17 (5 clones) 2,25 Mb	18%	SPN, QPRT, KIF22, FBRS
16q23-qter	bA303E16/bA21B21 (10 clones) 7,68 Mb	28%	CENPN, GCSH, CENPN, USP10, MLYCD, COX4NB, COX4I1, IRF8, CRISPLD2, ZFPM1, IL17C, MVD, TCF25
20qcent-q13.12	dJ324O17/bA347D21 (26 clones) 16,54 Mb	23%	REMI, HM13, DEFB124, TTLL9, PDRG1, XKR7, DNMT3B, MAPRE1, CBFA2T2, PIGU, GGTL3, ACSS2, GSS, SPAG4, EPB41L1, CTNBNL1, SLC32A1, ACTR5, PTPRT, SNX21, ACOT8, PLTP, CDH22, NCOA3
22q	P8708/bK799F10 (50 clones) 33,61 Mb	18%	CECR2, SLC25A18, ATP6V1E1, SYN3, TIMP3, PEX26, TUBA8, USP18, IGLV3, IGLV2, DDTL, CABIN_HUMAN, MYO18B, MFNG, PITPNB, NF2, CABP7, ASCC2, GAL3ST1, PIK3IP1, SYN3, CENPM, TNFRSF13C, SREBF2, SEPT3, WBP2NL, ARFGAP3, SMC1B, CERK, TBC1D22A

Tabla 26 B. Principales regiones con pérdidas detectadas por arrays genómicos en los LDCGB y posibles genes implicados.

Región	Clon inicial/final (n° de clones) Tamaño	Pérdida %	Genes candidatos
1p31.1	dJ1006B11/bA338F2 (12 clones) 12,96 Mb	18%	NEGR1, TNN3K, FPGT, LHX8, AK5, ZZZ3, USP33, LPHN2, ST6GALNAC3
1p21	bA146P11/dJ1077K16 (13 clones) 11,72 Mb	18%	PTBP2, Q3KQU0_HUMAN, SLC30A7, EXTL2, DPH5, AMY2B, AMY2A, AMY1A, PRMT6
1p13.3	dJ667F15/dJ1037B23 (7 clones) 5,02 Mb	18%	KIAA1324, CYB561D1, ATXN7L2, SYPL2, GPR61, GNAI3, AMIGO1, KCNA2, KCNA2, KCNA3, KCND3, WNT2B, ST7L, LRIG2, SYT6
2p12	bA335E8/bA495B16 (8 clones) 6,54 Mb	15%	CTNNA2, Q8NBL2_HUMAN
2q36.3	bA211K17/bA70L16 (3 clones) 2,43 Mb	18%	CCL20, WDR69
3p14-cent	bA154D3/bA312H1 (27 clones) 22,46 Mb	18%	PTPRG, FEZF2, MAGI1, FAM19A1, FRMD4B, FOXP1, RYBP, GBE1, PDZRN3, ROBO2, CADM2, VGLL3
3q13.31-q13.32	bA324H4/bA295B8 (3 clones) 1,67 Mb	23%	
5q21.1	bK1564E20/bK2068C11 (3 clones) 1,93 Mb	33%	TMEM157
6q	bA767J14/PAC57H24 (113 clones) 106,69 Mb	15%	BAI3, RIMS1, COL12A1, COX7A2, TMEM30A, MYO6, IRAK1BP1, BCKDHB, SNAP91, RARS2, SPACA1, RNGTT, MDN1, MAP3K7, FHL5, COQ3, SFRS18, ASCC3, GRIK2, AIM1, SOBP, SCML4, NR2E1, REV3L, WISP3, RSHL3, KPNA5, KPNA5, DCBLD1, GOPC, SLC35F1, MAN1A1, PKIB, RNF217, RSPO3, PTPRK, LAMA2, EPB41L2, ENPP1, MYB, PEX7, AIG1, SF3B5, STX11, UTRN, ESR1, TULP4, FNDC1, MASI, IGF2R, PARK2, MLLT4, PSMB1
8q23.1	bA294M6/bA114O8 (2 clones) 0,52 Mb	25%	
10q25.1-q26.3	bA163F15/PAC137E24 (30 clones) 25,01 Mb	15%	XPNPEP1, SMC3, RBM20, GPAM, TECTB, TCF7L2, TDRD1, C10orf118, ATRNL1, GFRA1, KIAA1598, C10orf46, INPP5F, C10orf19, SEC23IP, FGFR2, ATE1, PLEKHA1, HTRA1, NP_071409.2, OAT, ZRANB1, CTBP2, C10orf90, DOCK1, TXNL2, BNIP3
11q14.3	bA325I16/bA291N1 (2 clones) 0,26 Mb	25%	
17p13.1	bA199F11 (1 clon) 0,162 Mb	18%	SHBG, FXR2, SAT2, ATP1B2, WDR79, EFN3, TP53, DNAH2
21q21.1-q21.3	bA25F24/dJ64G16 (6 clones) 5,26 Mb	13%	CYYR1

3.1.1. Validación mediante HISF de las alteraciones detectadas por arrays genómicos

La selección de los pacientes se realizó en base a dos factores: disponibilidad de la muestra, tejido embebido en parafina o células fijadas, y a la presencia de algún cambio genómico en alguna de las siguientes regiones: 1q21, 2p16, 10q23 y 17p13.1. Los resultados obtenidos por ambas metodologías, HISF y CGH-array, se muestran en la Tabla 27 para las regiones 1q21-q22, 2p16.1 y 10q23 y en la Tabla 28 para la región del cromosoma 17p.

Tabla 27. Estudio comparativo entre los resultados obtenidos por HISF y CGH-Array en las regiones cromosómicas 1q21-q22, 2p16.1 y 10q23.1 analizadas con los BAC: RP11-98D18, RP11-172I6; RP11-440P5, RP11-373L24; y RP11-165M8, RP11-380G5; respectivamente. Todos los análisis de HISF se realizaron sobre muestras de células fijadas.

Paciente	1q21-q22 (RP11-98D18 y RP11-172I6)		2p16.1 (RP11-440P5 y RP11-373L24)		Paciente	10q23.1 (RP11-165M8 y RP11-380G5)	
	HISF	CGH-Array	HISF	CGH-Array		HISF	CGH-Array
2320	Ganancia 0% (0/203)	Normal	Ganancia 0% (0/237)	Normal	2320	Pérdida 8% (19/235)	Normal
2639	Ganancia 69% (176/255)	Ganancia	Ganancia 67% (155/230)	Ganancia	2379	Pérdida 32% (70/217)	Pérdida
2943	Ganancia 6% (12/215)	Normal	Ganancia 72% (161/225)	Ganancia	2943	Pérdida 47% (123/262)	Pérdida
3403	Ganancia 67% (164/243)	Ganancia	Ganancia 6% (13/211)	Normal	3403	Pérdida 3% (9/298)	Normal

En general se observó una buena correlación entre los resultados obtenidos por CGH-arrays y por HISF. Así, la región de 1q21 se analizó por HISF en cuatro pacientes. Dos de ellos tenían ganancias en esa región por arrays genómicos y la HISF mostró ganancias en esa región, mientras que los dos casos restantes eran normales por CGH-arrays y por HISF. El análisis mediante HISF de la región 2p16 se realizó en cuatro casos: tres de ellos mostraron ganancias por arrays genómicos y la HISF confirmó la presencia de tres señales de hibridación en los tres casos (Figura 45). El caso restante no mostró cambios en 2p16 por ambas metodologías. Finalmente, la región de 10q23 se analizó en 4 pacientes. Dos de ellos mostraron la región perdida por arrays genómicos y además presentaron una señal de hibridación mediante HISF. Por el contrario, los dos casos sin cambios en 10q23 por arrays genómicos también los fueron por HISF (Tabla 27).

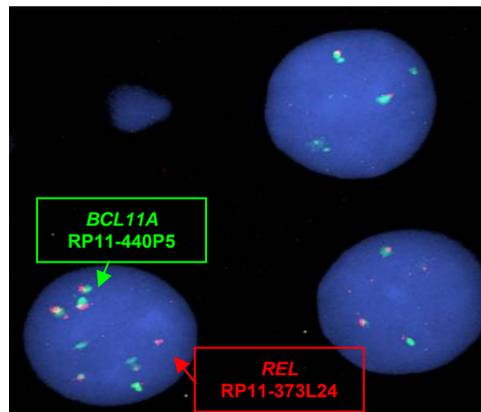


Figura 45. Análisis de HISF en células fijadas de pacientes diagnosticados de LDCGB con ganancias en la región cromosómica 2p16.1. La sonda de doble color correspondiente a la región 2p16 presenta los BACs RP11-440P5 y RP11-373L24 marcados en verde y rojo, respectivamente. Esta región contiene a dos genes candidatos, *BCL11A* y *REL*. Se pueden observar varias señales de hibridación tanto para la sonda marcada en rojo como para la marcada en verde.

Para confirmar los cambios en 17p13 se analizaron, en muestras de células fijadas y en muestras de tejido embebido en parafina, un total de 8 pacientes incluidos en el estudio. La realización de la HISF sobre tejido en parafina permite la utilización de tejidos con la morfología intacta. Cuatro de ellos mostraron delección en 17p13, dos pacientes mostraron ganancias y los dos casos restantes no mostraron cambios en 17p13.1. En todos los casos la HISF confirmó los resultados obtenidos mediante los arrays genómicos (Tabla 28).

Tabla 28. Comparativa entre los resultados obtenidos por HISF y CGH-Array en la región cromosómica 17p13.1 analizada con los BAC: RP11-186B7 y RP11-199F11. Los análisis de HISF se realizaron sobre células fijadas y sobre tejido incluido en parafina.

Región cromosómica 17p13.1 (RP11-186B7 y RP11-199F11)					
	Células Fijadas			Parafina	
Paciente	HISF	CGH-Array	Paciente	HISF	CGH-Array
2320	Ganancia 17% (40/230)	Ganancia	2474	Pérdida 32% (65/205)	Pérdida
2639	Ganancia 54% (124/228)	Ganancia	2478	Pérdida 21% (48/233)	Pérdida
2641	Pérdida 5% (11/224)	Normal	3514	Pérdida 13% (44/332)	Pérdida
2943	Pérdida 10% (23/223)	Normal			
3403	Pérdida 32% (88/245)	Pérdida			

3.2. Correlación entre los cambios genómicos y las características clínicas y biológicas

La Tabla 29 muestra la correlación existente entre los cambios genómicos (ganancias y pérdidas) detectados por arrays genómicos y las características clínicas y biológicas más relevantes de este grupo de LDCGB agresivos. Los pacientes con pérdidas en 17p13.1 tenían niveles elevados de LDH ($p < 0,05$), mientras que los pacientes con ganancias en 1q, 3p, 6p, 7p, 16, 20q o 22, así como pérdidas en 5q21.1 y 10q23.31 tenían un estadio avanzado de Ann-Arbor (III-IV) ($p < 0,05$). Además, la presencia de ganancias en 11q o 12q se correlacionó con la presencia de masa tumoral voluminosa ($p < 0,05$).

Tabla 29. Correlación entre los cambios genómicos detectados por arrays genómicos y las características clínicas y biológicas más destacadas de los pacientes con LDCGB.

Estadio Ann-Arbor III-IV		Edad (<60años)	Síntomas-B		Masa Bulky	↑ LDH
Ganancias	Pérdidas	Ganancias	Ganancias	Pérdidas	Ganancias	Pérdidas
1p36	5q21.1	3p21.1	12q13	2p12	11q23.3	17p13.3
1q21-22	10q23.3	12q14.1		2q36.3	12q14.1	
1q32		12q24		11q14.3		
3p21.1						
6p21.1						
7p22.1						
16p11.2						
16q23						
20q						
22						

P < 0.05 para todas las correlaciones; LDH, lactato deshidrogenasa

3.3. Correlación entre los cambios genómicos y la supervivencia de los pacientes con LDCGB

Se analizaron todas las variables clínicas, biológicas y genómicas en relación a la supervivencia. En cuanto a las variables clínicas, solamente la edad (pacientes mayores de 60 años) se correlacionó con una menor supervivencia mientras que el IPI no tenía impacto sobre la supervivencia (Figura 46).

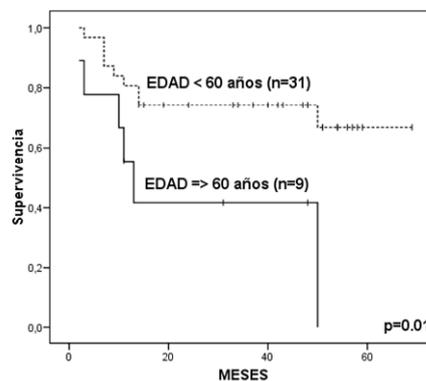


Figura 46. Diagrama de Kaplan-Meier de la supervivencia esperada para los LDCGB de acuerdo con la edad. Los pacientes mayores de 60 años tenían supervivencia menor: mediana de supervivencia 13 meses frente a los menores de 60 años (p=0,01).

En cuanto a los cambios genómicos cabe señalar que los pacientes con pérdida en 10q23.31, que contiene el gen *PTEN*, o pérdida en 17p13.1 ($p=0,03$ y $p=0,02$ respectivamente), tenían una supervivencia más corta (mediana de supervivencia de 10 meses para los pacientes con pérdida en 10q23 y no alcanzada para los que no mostraron alteración en 10q23; y mediana de supervivencia de 11 meses para los pacientes con pérdida en 17p13 y no alcanzada para aquellos pacientes sin alteración en 17p13) (Figura 47). Las pérdidas en la región 17p13.1 también se asociaron con la falta de respuesta al tratamiento MegaCHOP. Estos resultados concuerdan con estudios anteriores en los que la inactivación del gen *TP53* se asoció con progresión clínica, mal pronóstico, resistencia a quimioterapia y bajas tasas de remisión completa en pacientes con linfomas LNH-B agresivos.³⁵

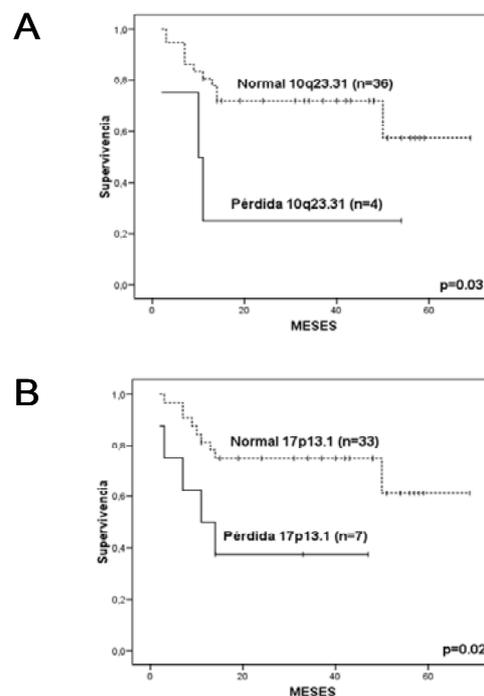


Figura 47. Diagrama de Kaplan-Meier de la supervivencia esperada para los LDCGB de acuerdo con los cambios genómicos. A) Las pérdidas en la región 10q23, que contiene al gen *PTEN*, se asociaron con una supervivencia inferior: mediana de supervivencia 10 meses frente a los que no tienen cambios en 10q23 ($p=0,03$); B) Las pérdidas en 17p13 (gen *TP53*) estaban asociados con una supervivencia más corta: mediana de supervivencia 11 meses frente a los que no tienen cambios en 17p13 ($p=0,02$).

No había ninguna otra variable biológica o cambio genómico relacionados con la supervivencia. El análisis multivariante mediante el modelo de regresión de Cox demostró que sólo la edad ($p=0,01$) y la pérdida en 10q23.31 ($p=0,03$) estaban relacionadas con supervivencia más corta. Recientemente, se ha descrito que en el 37% de los LDCGB hay pérdidas o una expresión reducida de *PTEN* y este hallazgo se ha asociado con supervivencia más corta en los estudios retrospectivos realizados en LDCGB.²⁸¹ Además, se ha correlacionado la pérdida de *PTEN* con supervivencia más corta en los LNH del centro germinal.²⁸² Estos datos sugieren que la ruta de *PTEN/PI3K/ATK* podría estar relacionada con el desarrollo y la progresión de los LDCGB.^{281;283}

3.4. Asociación entre los cambios genómicos y la respuesta al tratamiento con el protocolo MegaCHOP

Después de tres ciclos de MegaCHOP el 42,5% de los pacientes (17 de 40) alcanzaron una RC, el 32,5% estaban en RP, mientras que los 10 pacientes restantes no respondieron al tratamiento (FT). En los pacientes que alcanzaron la RC después de MegaCHOP las alteraciones más frecuentes observadas fueron ganancias en 3p21.1, 6p21.1, 11q12.2-q13.1 y 11q23.3 (44%), así como pérdidas en 8q23.1 (38%) y 5q21.1 (31%). En los pacientes que tuvieron una RP o que fallaron al tratamiento se observaron más frecuentemente ganancias en regiones como 1q21-q22, 11q23 (57%) y 3p21.1 (52%), así como pérdidas en 5q21.1 (35%), 11q14.3 (30%), 3q13.31-q13.32 y 17p13.1 (26%).

Además, dentro de los pacientes que alcanzaron RC al tratamiento se detectaron ganancias en 2q37, 3p25.3, 17p13.1 y pérdidas en 2p12, 6q, 10q25.1-q26, 17p13.2, que sin ser las alteraciones más frecuentes dentro de este grupo sí tenían una mayor frecuencia que la detectada en el grupo de los que no responden al tratamiento. Por el contrario, las ganancias en 1p35-p34, 1q21-q22, 2p16.1, 14q32, 16p11.2 y 17p13.2 y las pérdidas en 1p13.3, 2q36.3,

3p25.3 y 17p13.1 fueron más frecuentes en los pacientes que no alcanzaron la RC (Figura 48).

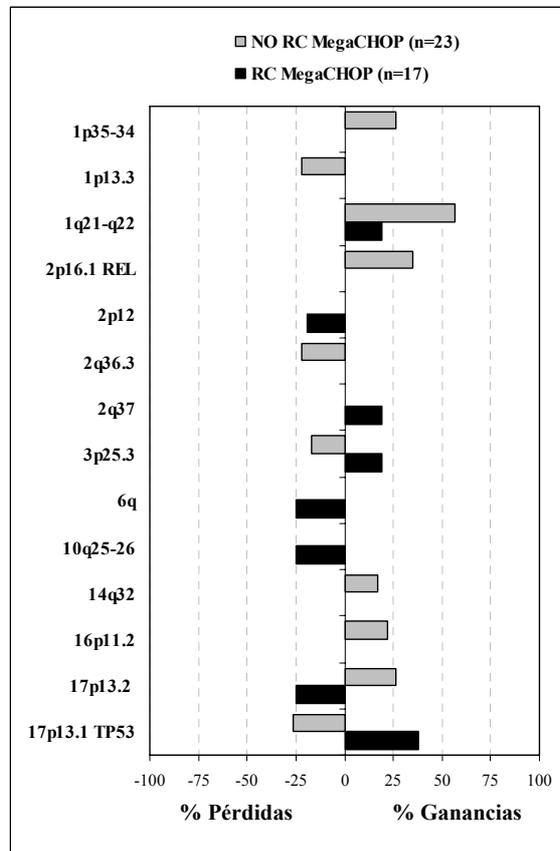


Figura 48. Comparación entre los cambios genómicos y la respuesta al tratamiento con MegaCHOP. La frecuencia de las ganancias (derecha) y las pérdidas (izquierda) de los pacientes que obtuvieron RC se muestran en negro, mientras que las barras grises pertenecen a los pacientes que no alcanzaron RC.

La región comúnmente ganada en 8 de los 40 pacientes analizados se localizaba a nivel de 2p16 con una longitud de 634 Kb, entre los BACs bA440P5 y bA373L24. Esta región contiene a dos genes candidatos, *BCL11A* y *REL*, relacionados con los linfomas. Hay que destacar que estas ganancias en 2p16 solamente se observaron en los pacientes que no alcanzaron una RC después de la finalización del tratamiento con MegaCHOP. Además, la presencia de ganancias en 2p16 se asoció con progresión de la enfermedad o recaída después de la quimioterapia ($p=0,008$). Las ganancias en 2p se han identificado como alteraciones

frecuentes (20%) en los LDCGB,^{45;50;197-199;284-286} y es la alteración más frecuente en los linfomas de Hodgkin (50%).^{287;288} La región comúnmente alterada tiene un tamaño de 4,2 Mb y se sitúa en 2p15-16.^{287;288} Mediante los arrays genómicos, se ha podido restringir la mínima región alterada a menos de 700 Kb. En esta región se han localizado dos oncogenes, *BCL11A* y *REL*, ambos involucrados en la linfogénesis.^{50;289} La sobreexpresión de ambos genes también se detectó por RQ-PCR en todos los casos que mostraron amplificación de la región de 2p.⁵⁰ En estudios realizados con arrays genómicos concluyen que el oncogén *REL* puede desempeñar un papel más importante que *BCL11A* en la patogénesis de los LDCGB.²³⁷

Por otro lado, se observó que ninguno de los pacientes que mostraron pérdidas en 17p13.1 (gen *TP53*) alcanzaron la RC después del tratamiento con MegaCHOP (p=0.02). Ambas variables, ganancias en 2p16 y pérdidas en 17p13.1, fueron seleccionadas para el modelo de regresión de la respuesta al protocolo de tratamiento. En el análisis multivariante, sólo la presencia de ganancias en 2p16.1 se asoció con la resistencia al tratamiento con MegaCHOP, lo que puede sugerir que este cambio genético podría incluirse como un factor pronóstico de los LDCGB.

3.5. Distribución de los pacientes en LDCGB del CG y del No CG

Con el fin de asociar las alteraciones genómicas detectadas mediante los arrays genómicos con las características inmunofenotípicas de los LDCGB se correlacionaron las alteraciones genómicas con el algoritmo inmunohistológico que se ha propuesto¹⁶⁶ (Figura 3 Introducción). Este algoritmo clasifica a este tipo de linfoma agresivo según su origen celular en LDCGB del centro germinal (CG) y LDCGB no del centro germinal (No CG) y propone clasificar a estos linfomas según sea la expresión de tres marcadores: CD10, Bcl-6 y MUM1.

Teniendo en cuenta la expresión de los tres marcadores se pudieron clasificar 38 casos de los 40 LDCGB incluidos en el estudio. Este algoritmo separó 17 LDCGB en la rama del CG (45%) y 21 en la de los LDCGB No CG (55%) (Figura 49).

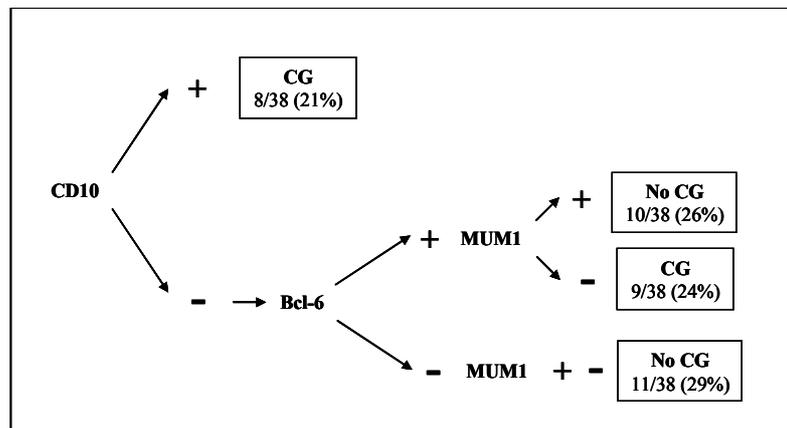


Figura 49. Clasificación de los 38 LDCGB en base a los estudios realizados mediante arrays de tejidos. Los LDCGB se clasifican en CG y No CG dependiendo de la expresión de tres marcadores: CD10, Bcl-6 y MUM1.

Los pacientes incluidos dentro del grupo de LDCGB CG mostraron como alteraciones más frecuentes ganancias en las regiones 3p21.1, 6p21.1, 11q12.2-q13.1, 12q14.1 (59%); 11q23.3 (53%); 1q21-22, 1q32, 7p22.1 (47%); 1p36, 1q23.3, 7q22.1, 20qcent-q13 (41%); 2p16.1 (*REL* y *BCL11A*), 12q24, 16q23-qter, 17p13.2 (35%); y las pérdidas en 5q21.1 (35%); 2q36.3, 3q13.31-q13.32, 11q14.3 (29%). Dentro del grupo de los LDCGB No CG las ganancias más frecuentes se localizaban a nivel de 11q23.3 (43%), 1q32, 3p21.1 (33%), 1q21-q22, 1q23.3, 11q12.2-q13.1 (29%) y las pérdidas en 5q21.1, 17p13.2 (29%); 1p35-p34, 8q23.1, 10q25.1-q26.3, 17p13.1 (24%). (Tabla 30).

Tabla 30. Alteraciones genéticas detectadas por arrays genómicos en los pacientes diagnosticados de LDCGB y agrupados en CG y No CG según el algoritmo propuesto por Hans.¹⁶⁶ Las alteraciones que presentan diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos se muestran con el símbolo *.

Ganancias %				Pérdidas %			
Región	CG n=17	No-CG n=21	P	Región	CG n=17	No-CG n=21	P
1p36	41% (7/17)	14% (3/21)	0.1	1p35-p34	6% (1/17)	24% (5/21)	0.1
1p35-p34	29% (5/17)	14% (3/21)	0.3	1p31.1	24% (4/17)	14% (3/21)	0.5
1q21-q22	47% (8/17)	29% (6/21)	0.4	1p21	24% (4/17)	14% (3/21)	0.5
1q23.3	41% (7/17)	29% (6/21)	0.5	1p13.3	18% (3/17)	19% (4/21)	0.9
1q32	47% (8/17)	33% (7/21)	0.5	1q42.13	12% (2/17)	19% (4/21)	0.6
1q42.13	18% (3/17)	14% (3/21)	0.8	2q36.3	29% (5/17)	5% (1/21)	0.07
2p23	0% (0/17)	14% (3/21)	0.1	3p14-cent	24% (4/17)	14% (3/21)	0.5
2p16	35% (6/17)	0% (0/21)	0.01*	3q13.31-q13.32	29% (5/17)	10% (2/21)	0.1
2q37	18% (3/17)	10% (2/21)	0.5	5q21.1	35% (6/17)	29% (6/21)	0.7
3p25.3	24% (4/17)	10% (2/21)	0.3	6q	12% (2/17)	19% (4/21)	0.6
3p21.1	59% (10/17)	33% (7/21)	0.3	8q23.1	18% (3/17)	24% (5/21)	0.7
6p21.1	59% (10/17)	27% (5/21)	0.1	10q23.1	6% (1/17)	14% (3/21)	0.4
7p22.1	47% (8/17)	19% (4/21)	0.1	10q25.1-q26.3	6% (1/17)	24% (3/21)	0.4
7q22.1	41% (7/17)	24% (5/21)	0.4	11q14.3	29% (5/17)	19% (4/21)	0.5
9p21.3	0% (0/17)	10% (2/21)	0.2	17p13.2	12% (2/17)	29% (6/21)	0.3
9q34-ter	29% (5/17)	19% (4/21)	0.5	17p13.1	12% (2/17)	24% (5/21)	0.4
11q12.2-q13.1	59% (10/17)	29% (6/21)	0.2	20qcent-q13	6% (1/17)	14% (3/21)	0.4
11q23.3	53% (9/17)	43% (9/21)	0.7	21q21.1-q21.3	24% (4/17)	5% (1/21)	0.1
12q14.1	59% (10/17)	24% (5/21)	0.1				
12q24	35% (6/17)	14% (3/21)	0.2				
14q32.12	18% (3/17)	5% (1/21)	0.2				
16p11.2-cent	24% (4/17)	10% (2/21)	0.3				
16q23-ter	35% (6/17)	19% (4/21)	0.3				
17p13.2	35% (6/17)	10% (2/21)	0.1				
17p13.1	12% (2/17)	5% (1/21)	0.4				
20qcent-q13	41% (7/17)	10% (2/21)	0.07				
22q	29% (5/17)	10% (2/21)	0.1				

* Estadísticamente significativo

Entre los dos subgrupos de linfomas, LDCGB CG y LDCGB No CG, únicamente las ganancias en 2p16 (genes *BCL11A* y *REL*), se asociaban con los LDCGB CG ($p=0,01$). A pesar de que se observaban otras alteraciones tales como las ganancias en 1p36, 6p21.1, 7p22.1, 12q14.1, 12q24, 17p13.2, 20qcent-q13, 22q y las pérdidas en el cromosoma 2q36.2, 3q13.31-q13.32 y 21q21.1-21.3 las diferencias entre los dos grupos de LDCG no alcanzaron la significación estadística. De igual manera, dentro del grupo de LDCGB No CG se observaban ganancias en 2p23 y 9p21.3 y pérdidas en 1p34-p35, 10q23.1, 10q25.1-q26, 17p13 y 20qcent-q13, pero las diferencias tampoco alcanzaron la significación estadística. Cabe destacar que las ganancias (6 casos de 17) en la región del cromosoma 17p13.2 se asociaron con los LDCGB del CG mientras que las pérdidas (6 casos de 21) en esa misma región eran más frecuentes en los LDCGB del No CG. Coincidiendo con estudios realizados recientemente, las ganancias en los cromosomas 1q23.3, 7q22 y 12q se detectan más frecuentemente (>40%) en los pacientes agrupados en LDCGB del CG así como las pérdidas en el brazo largo del cromosoma 6 y las ganancias en 9p en el grupo del No CG (19%).^{290;291}

En el análisis de los pacientes con LDCGB divididos en No CG y CG no encontramos ninguna variable con significación estadística relacionada con la supervivencia de estos pacientes. Sin embargo, es necesario señalar que existía una tendencia hacia una supervivencia inferior del grupo clasificado mediante arrays de tejidos como No CG con respecto al CG. Además, analizando las variables genéticas alteradas dentro de cada grupo, las ganancias en el cromosoma 2p16 y las pérdidas en 17p13.2, mostraron una tendencia con una supervivencia más corta en el grupo de los CG y en el grupo de los No CG, respectivamente (Figura 50).

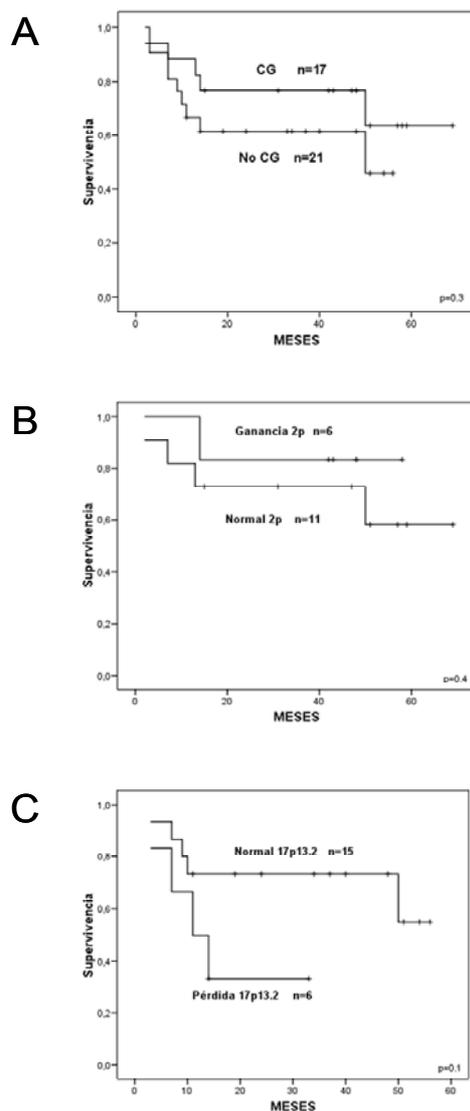


Figura 50. Diagrama de Kaplan-Meier de la supervivencia esperada para los grupos de LDCGB clasificados de acuerdo con los hallazgos inmunohistoquímicos. A) Los pacientes que se agruparon en LDCGB No CG mostraron una tendencia a una supervivencia inferior: mediana de supervivencia 50 meses frente a los que se agruparon dentro de los LDCGB del CG ($p=0,3$). B) Kaplan-Meier para los pacientes del CG que muestran ganancias en 2p16.1. Los pacientes que mostraron ganancias en la región del cromosoma 2p16.1 tenían tendencia a una mayor supervivencia que los que mostraron la región sin alteración ($p=0,4$). C) Kaplan-Meier para los pacientes del NO CG que muestran pérdidas de 17p13.2. Los pacientes que mostraron pérdidas en la región del cromosoma 17p13.2, mediana de supervivencia 11 meses, tenían tendencia a una supervivencia inferior que los que mostraron la región sin pérdidas ($p=0,1$).

Cabe destacar que las ganancias de 2p, con afectación de los genes *BCL11A* y *REL*, estaban significativamente asociadas con los LDCGB CG ($p=0,01$). Este hallazgo es

coincidente con los estudios previamente publicados.^{237;292} Estos estudios demostraron que la expresión de *BCL11A* y *REL* estaba frecuentemente relacionada con el grupo de LDCGB CG cuyo pronóstico es más favorable. En nuestro estudio, encontramos que las ganancias en 2p16.1 dentro del grupo de los LDCGB CG estaban relacionadas con una supervivencia mayor. Aunque en nuestro estudio esta relación no alcanzaba significación estadística se ha descrito la sobreexpresión del gen *REL* en los LDCGB con ganancias en 2p.²⁹²

Resumiendo, los resultados obtenidos en el análisis del genoma mediante arrays genómicos han contribuido a identificar nuevas regiones asociadas con peor supervivencia en pacientes con LDCGB de alto riesgo, y además, puede ayudar en la estratificación de este grupo de linfomas agresivos. En consecuencia, la investigación de 2p, 10q y 17p debe llevarse a cabo en este grupo de pacientes con LDCGB e IPI alto.

CONCLUSIONES

1. Los arrays de genómicos son una metodología factible, objetiva y fiable, que permiten, en un solo experimento, el análisis de las posibles alteraciones cromosómicas debidas a las ganancias o pérdidas de material genético en un individuo o en una muestra tumoral.
2. El uso de los arrays genómicos en los linfomas no hodgkinianos de línea B ha puesto de manifiesto la existencia de cambios genómicos, ganancias y pérdidas, en más del 90% de los casos.
3. El estudio de los LEZM reveló que:
 - 3.1. Las alteraciones más frecuentes correspondían a ganancias de las regiones 4q22.1, 1q21.3-q22, 6q25.3, 20q13.33 y 3q28 así como a pérdidas de 7q22.1-q31, 2q23.3-q24.1 y 17p13.3-p13.1. Algunas de ellas, como las ganancias en 4q22, no habían sido descritas en estos linfomas.
 - 3.2. Las pérdidas en 7q22.1 se observaban en el 49% de estos enfermos. El análisis de alta resolución delimitó dicha pérdida a un tamaño de 1,51 Mb en la que se localizan los genes *MUC3*, *MUC12*, *SH2B2*, y *CUX1*.
 - 3.3. La edad avanzada y las pérdidas en 17p13 se asociaron con la progresión de la enfermedad de manera independiente.
4. El estudio de los linfomas difusos de célula grande B, incluidos en el protocolo de tratamiento MegaCHOP, demostró que:
 - 4.1. Las ganancias detectadas con mayor frecuencia se localizaban en las regiones cromosómicas 11q23.3, 3p21.1 y 6p21.1 mientras que las pérdidas afectaban preferentemente a 5q21.1 y 8q23.1.

- 4.2. La edad avanzada y las pérdidas en 10q23.3 se asociaron con una menor supervivencia de manera independiente, mientras que las ganancias en 2p16.1 (*REL* y *BCL11A*) se asociaron con progresión o recaída después del tratamiento.
5. Por tanto, en este trabajo doctoral se ha demostrado la utilidad de los CGH-arrays en la detección de nuevas alteraciones genómicas que pueden usarse como biomarcadores con valor pronóstico en los linfomas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Hodgkin T. On some morbid experiences of the absorbent glands and spleen. *Medico-ChirurgicalTrans* 1832;17:68-97.
2. Brill N, Baehr G, Rosenthal N. Generalized giant lymph follicle hyperplasia of the lymph nodes and spleen. A hiterto undescribed type. *J.A.M.A* 1925;84:668-671.
3. Symmers D. Follicular lymphadenopathy with splenomegaly: a newly recognized disease of the lymphatic system. *Arch Pathol* 1927;3:816-820.
4. Gall EA, Mallory TB. Malignant lymphoma: a clinico-pathologic survey of 618 cases. *Am JPathol* 1942;18:381-429.
5. Rappaport H. Tumors of the hematopoietic system. *Atlas of tumor pathology*. Washington DC: Armed Force Institute of Pathology 1966;8:97-161.
6. Lukes R.L., Collins R.D. Immunobiological characterization of human malignant lymphomas. *Cancer* 1974;34:1488-1503.
7. Lennert K, Mohri N, Stein H, Kaiserling E. The histopathology of malignant lymphoma. *Br J Haematol*. 1975;31:29-43.
8. National Cancer Institute sponsored study of classifications of non-Hodgkin's lymphomas: summary and description of a working formulation for clinical usage. The Non-Hodgkin's Lymphoma Pathologic Classification Project. *Cancer* 1982;49:2112-2135.
9. Harris NL, Jaffe ES, Stein H et al. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood* 1994;84:1361-1392.
10. Montserrat E, Campo E. [A new international classification of lymphoid neoplasms. Farewell to the Working Formulation, Kiel and company?]. *Med Clin.(Barc.)* 1995;104:185-187.

11. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J et al. World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting-Airlie House, Virginia, November 1997. *J Clin.Oncol.* 1999;17:3835-3849.
12. Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW. World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and Genetics of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon: IARC Press; 2001.
13. Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Isaacson PG. Classification of lymphoid neoplasms: the microscope as a tool for disease discovery. *Blood* 2008;112:4384-4399.
14. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon: International Agency of Research on Cancer; 2008.
15. Nowell PC, Hungerford DA. Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. *J.Natl.Cancer Inst.* 1960;25:85-109.
16. Bernheim A, Berger R, Lenoir G. Cytogenetic studies on African Burkitt's lymphoma cell lines: t(8;14), t(2;8) and t(8;22) translocations. *Cancer Genet.Cytogenet.* 1981;3:307-315.
17. Ohno H, Doi S, Fukuhara S et al. A newly established human lymphoma cell line, FL-18, carrying a 14;18 translocation. *Jpn.J Cancer Res.* 1985;76:563-566.
18. Weisenburger DD. Non-Hodgkin's lymphomas of primary follicle/mantle zone origin. *Leukemia* 1991;5 Suppl 1:26-29.
19. Leroux D, Le MF, Gressin R et al. Non-Hodgkin's lymphomas with t(11;14)(q13;q32): a subset of mantle zone/intermediate lymphocytic lymphoma? *Br.J Haematol.* 1991;77:346-353.

20. Zech L, Haglund U, Nilsson K, Klein G. Characteristic chromosomal abnormalities in biopsies and lymphoid-cell lines from patients with Burkitt and non-Burkitt lymphomas. *Int.J.Cancer* 1976;17:47-56.
21. Bernicot I, Douet-Guilbert N, Le Bris MJ et al. Molecular cytogenetics of IGH rearrangements in non-Hodgkin B-cell lymphoma. *Cytogenet.Genome Res.* 2007;118:345-352.
22. Janz S, Potter M, Rabkin CS. Lymphoma- and leukemia-associated chromosomal translocations in healthy individuals. *Genes Chromosomes.Cancer* 2003;36:211-223.
23. Bea S, Campo E. Secondary genomic alterations in non-Hodgkin's lymphomas: tumor-specific profiles with impact on clinical behavior. *Haematologica* 2008;93:641-645.
24. Heim S, Mitelman F. *Cancer cytogenetics. Chromosomal and molecular genetic aberrations of tumor cells.*: Wiley-Blackwell; 2009.
25. Veldman T, Vignon C, Schrock E, Rowley JD, Ried T. Hidden chromosome abnormalities in haematological malignancies detected by multicolour spectral karyotyping. *Nat.Genet.* 1997;15:406-410.
26. Bentz M, Huck K, du MS et al. Comparative genomic hybridization in chronic B-cell leukemias shows a high incidence of chromosomal gains and losses. *Blood* 1995;85:3610-3618.
27. Jarosova M, Papajik T, Holzerova M et al. High incidence of unbalanced chromosomal changes in mantle cell lymphoma detected by comparative genomic hybridization. *Leuk.Lymphoma* 2004;45:1835-1846.
28. Ruiz-Ballesteros E, Mollejo M, Mateo M et al. MicroRNA losses in the frequently deleted region of 7q in SMZL. *Leukemia* 2007;21:2547-2549.

29. Kimm LR, deLeeuw RJ, Savage KJ et al. Frequent occurrence of deletions in primary mediastinal B-cell lymphoma. *Genes Chromosomes.Cancer* 2007;46:1090-1097.
30. Ferreira BI, Garcia JF, Suela J et al. Comparative genome profiling across subtypes of low-grade B-cell lymphoma identifies type-specific and common aberrations that target genes with a role in B-cell neoplasia. *Haematologica* 2008;93:670-679.
31. Camacho E, Hernandez L, Hernandez S et al. ATM gene inactivation in mantle cell lymphoma mainly occurs by truncating mutations and missense mutations involving the phosphatidylinositol-3 kinase domain and is associated with increasing numbers of chromosomal imbalances. *Blood* 2002;99:238-244.
32. Fang NY, Greiner TC, Weisenburger DD et al. Oligonucleotide microarrays demonstrate the highest frequency of ATM mutations in the mantle cell subtype of lymphoma. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2003;100:5372-5377.
33. Austen B, Skowronska A, Baker C et al. Mutation status of the residual ATM allele is an important determinant of the cellular response to chemotherapy and survival in patients with chronic lymphocytic leukemia containing an 11q deletion. *J Clin.Oncol.* 2007;25:5448-5457.
34. Pasqualucci L, Compagno M, Houldsworth J et al. Inactivation of the PRDM1/BLIMP1 gene in diffuse large B cell lymphoma. *J Exp.Med.* 2006;203:311-317.
35. Ichikawa A, Kinoshita T, Watanabe T et al. Mutations of the p53 gene as a prognostic factor in aggressive B-cell lymphoma. *N.Engl.J.Med.* 1997;337:529-534.
36. Mintzer D, Bagg A. Clinical syndromes of transformation in clonal hematologic disorders. *Am J Med* 2001;111:480-488.
37. Ng MH. Death associated protein kinase: from regulation of apoptosis to tumor suppressive functions and B cell malignancies. *Apoptosis.* 2002;7:261-270.

38. Leroy K, Haioun C, Lepage E et al. p53 gene mutations are associated with poor survival in low and low-intermediate risk diffuse large B-cell lymphomas. *Ann.Oncol.* 2002;13:1108-1115.
39. Sohn SK, Jung JT, Kim DH et al. Prognostic significance of bcl-2, bax, and p53 expression in diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Hematol.* 2003;73:101-107.
40. Maartense E, Kramer MH, le CS et al. Lack of prognostic significance of BCL2 and p53 protein overexpression in elderly patients with diffuse large B-cell non-Hodgkin's lymphoma: results from a population-based non-Hodgkin's lymphoma registry. *Leuk.Lymphoma* 2004;45:101-107.
41. Young KH, Weisenburger DD, Dave BJ et al. Mutations in the DNA-binding codons of TP53, which are associated with decreased expression of TRAILreceptor-2, predict for poor survival in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2007;110:4396-4405.
42. Cheung KJ, Horsman DE, Gascoyne RD. The significance of TP53 in lymphoid malignancies: mutation prevalence, regulation, prognostic impact and potential as a therapeutic target. *Br.J Haematol.* 2009;146:257-269.
43. Robledo C, Garcia JL, Caballero D et al. Array comparative genomic hybridization identifies genetic regions associated with outcome in aggressive diffuse large B-cell lymphomas. *Cancer* 2009;115:3728-3737.
44. Viardot A, Moller P, Hogel J et al. Clinicopathologic correlations of genomic gains and losses in follicular lymphoma. *J Clin.Oncol.* 2002;20:4523-4530.
45. Bea S, Ribas M, Hernandez JM et al. Increased number of chromosomal imbalances and high-level DNA amplifications in mantle cell lymphoma are associated with blastoid variants. *Blood* 1999;93:4365-4374.
46. Kohlhammer H, Schwaenen C, Wessendorf S et al. Genomic DNA-chip hybridization in t(11;14)-positive mantle cell lymphomas shows a high frequency of

- aberrations and allows a refined characterization of consensus regions. *Blood* 2004;104:795-801.
47. Rubio-Moscardo F, Climent J, Siebert R et al. Mantle-cell lymphoma genotypes identified with CGH to BAC microarrays define a leukemic subgroup of disease and predict patient outcome. *Blood* 2005;105:4445-4454.
 48. Salaverria I, Zettl A, Bea S et al. Specific secondary genetic alterations in mantle cell lymphoma provide prognostic information independent of the gene expression-based proliferation signature. *J Clin.Oncol.* 2007;25:1216-1222.
 49. Sander S, Bullinger L, Leupolt E et al. Genomic aberrations in mantle cell lymphoma detected by interphase fluorescence in situ hybridization. Incidence and clinicopathological correlations. *Haematologica* 2008;93:680-687.
 50. Bea S, Colomo L, Lopez-Guillermo A et al. Clinicopathologic significance and prognostic value of chromosomal imbalances in diffuse large B-cell lymphomas. *J.Clin.Oncol.* 2004;22:3498-3506.
 51. Dierlamm J, Murga Penas EM, Bentink S et al. Gain of chromosome region 18q21 including the MALT1 gene is associated with the activated B-cell-like gene expression subtype and increased BCL2 gene dosage and protein expression in diffuse large B-cell lymphoma. *Haematologica* 2008;93:688-696.
 52. Zenz T, Dohner H, Stilgenbauer S. Genetics and risk-stratified approach to therapy in chronic lymphocytic leukemia. *Best.Pract.Res.Clin.Haematol.* 2007;20:439-453.
 53. Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D et al. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 1992;258:818-821.
 54. Pinkel D, Seagraves R, Sudar D et al. High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat.Genet.* 1998;20:207-211.

55. Hodgson G, Hager JH, Volik S et al. Genome scanning with array CGH delineates regional alterations in mouse islet carcinomas. *Nat.Genet.* 2001;29:459-464.
56. Fritz B, Schubert F, Wrobel G et al. Microarray-based copy number and expression profiling in dedifferentiated and pleomorphic liposarcoma. *Cancer Res.* 2002;62:2993-2998.
57. Pollack JR, Van de RM, Botstein D. Challenges in developing a molecular characterization of cancer. *Semin.Oncol.* 2002;29:280-285.
58. Cheung VG, Nowak N, Jang W et al. Integration of cytogenetic landmarks into the draft sequence of the human genome. *Nature* 2001;409:953-958.
59. Oostlander AE, Meijer GA, Ylstra B. Microarray-based comparative genomic hybridization and its applications in human genetics. *Clin.Genet.* 2004;66:488-495.
60. Smeets DF. Historical prospective of human cytogenetics: from microscope to microarray. *Clin.Biochem.* 2004;37:439-446.
61. Woodfine K, Carter NP, Dunham I, Fiegler H. Investigating chromosome organization with genomic microarrays. *Chromosome.Res.* 2005;13:249-257.
62. Burke DT, Carle GF, Olson MV. Cloning of large segments of exogenous DNA into yeast by means of artificial chromosome vectors. *Science* 1987;236:806-812.
63. Wada M, Little RD, Abidi F et al. Human Xq24-Xq28: approaches to mapping with yeast artificial chromosomes. *Am J Hum.Genet.* 1990;46:95-106.
64. Bellis M, Gerard A, Charlier JP et al. Construction and characterization of a partial library of yeast artificial chromosomes from human chromosome 21. *DNA Cell Biol.* 1991;10:301-310.
65. Green ED, Riethman HC, Dutchik JE, Olson MV. Detection and characterization of chimeric yeast artificial-chromosome clones. *Genomics* 1991;11:658-669.

66. Shizuya H, Birren B, Kim UJ et al. Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1992;89:8794-8797.
67. Willetts N and Skurray R. in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and Molecular Biology. 2, 1110-1113. 1987. Washington. Ref Type: Generic
68. Sternberg N. Bacteriophage P1 cloning system for the isolation, amplification, and recovery of DNA fragments as large as 100 kilobase pairs. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1990;87:103-107.
69. Greshock J, Naylor TL, Margolin A et al. 1-Mb resolution array-based comparative genomic hybridization using a BAC clone set optimized for cancer gene analysis. *Genome Res.* 2004;14:179-187.
70. Shaffer LG, Bejjani BA. A cytogeneticist's perspective on genomic microarrays. *Hum.Reprod.Update.* 2004;10:221-226.
71. Veltman JA, Schoenmakers EF, Eussen BH et al. High-throughput analysis of subtelomeric chromosome rearrangements by use of array-based comparative genomic hybridization. *Am J Hum.Genet.* 2002;70:1269-1276.
72. Vissers LE, de Vries BB, Osoegawa K et al. Array-based comparative genomic hybridization for the genomewide detection of submicroscopic chromosomal abnormalities. *Am J Hum.Genet.* 2003;73:1261-1270.
73. Bredel M, Bredel C, Juric D et al. Amplification of whole tumor genomes and gene-by-gene mapping of genomic aberrations from limited sources of fresh-frozen and paraffin-embedded DNA. *J.Mol.Diagn.* 2005;7:171-182.
74. Weiss MM, Snijders AM, Kuipers EJ et al. Determination of amplicon boundaries at 20q13.2 in tissue samples of human gastric adenocarcinomas by high-resolution microarray comparative genomic hybridization. *J Pathol* 2003;200:320-326.

75. Shaw CJ, Stankiewicz P, Bien-Willner G et al. Small marker chromosomes in two patients with segmental aneusomy for proximal 17p. *Hum.Genet.* 2004;115:1-7.
76. Buckley PG, Mantripragada KK, Benetkiewicz M et al. A full-coverage, high-resolution human chromosome 22 genomic microarray for clinical and research applications. *Hum.Mol.Genet.* 2002;11:3221-3229.
77. Kirchhoff M, Rose H, Lundsteen C. High resolution comparative genomic hybridisation in clinical cytogenetics. *J Med Genet.* 2001;38:740-744.
78. Sanlaville D, Lapierre JM, Turleau C et al. Molecular karyotyping in human constitutional cytogenetics. *Eur.J Med Genet.* 2005;48:214-231.
79. Shinawi M, Cheung SW. The array CGH and its clinical applications. *Drug Discov.Today* 2008;13:760-770.
80. Martinez-Climent JA, Alizadeh AA, Segraves R et al. Transformation of follicular lymphoma to diffuse large cell lymphoma is associated with a heterogeneous set of DNA copy number and gene expression alterations. *Blood* 2003;101:3109-3117.
81. Guillaud-Bataille M, Valent A, Soularue P et al. Detecting single DNA copy number variations in complex genomes using one nanogram of starting DNA and BAC-array CGH. *Nucleic Acids Res.* 2004;32:e112.
82. Hu DG, Webb G, Hussey N. Aneuploidy detection in single cells using DNA array-based comparative genomic hybridization. *Mol.Hum.Reprod.* 2004;10:283-289.
83. Larrabee PB, Johnson KL, Pestova E et al. Microarray analysis of cell-free fetal DNA in amniotic fluid: a prenatal molecular karyotype. *Am J Hum.Genet.* 2004;75:485-491.
84. DeVries S, Nyante S, Korkola J et al. Array-based comparative genomic hybridization from formalin-fixed, paraffin-embedded breast tumors. *J Mol.Diagn.* 2005;7:65-71.

85. Little SE, Vuononvirta R, Reis-Filho JS et al. Array CGH using whole genome amplification of fresh-frozen and formalin-fixed, paraffin-embedded tumor DNA. *Genomics* 2006;87:298-306.
86. Menten B, Maas N, Thienpont B et al. Emerging patterns of cryptic chromosomal imbalance in patients with idiopathic mental retardation and multiple congenital anomalies: a new series of 140 patients and review of published reports. *J.Med.Genet.* 2006;43:625-633.
87. Jacquemont ML, Sanlaville D, Redon R et al. Array-based comparative genomic hybridisation identifies high frequency of cryptic chromosomal rearrangements in patients with syndromic autism spectrum disorders. *J.Med.Genet.* 2006;43:843-849.
88. Thienpont B, Mertens L, de RT et al. Submicroscopic chromosomal imbalances detected by array-CGH are a frequent cause of congenital heart defects in selected patients. *Eur.Heart J.* 2007;28:2778-2784.
89. Lapaire O, Lu XY, Johnson KL et al. Array-CGH analysis of cell-free fetal DNA in 10 mL of amniotic fluid supernatant. *Prenat.Diagn.* 2007;27:616-621.
90. Shinawi M, Erez A, Shardy DL et al. Syndromic thrombocytopenia and predisposition to acute myelogenous leukemia caused by constitutional microdeletions on chromosome 21q. *Blood* 2008;112:1042-1047.
91. Wessendorf S, Schwaenen C, Kohlhammer H et al. Hidden gene amplifications in aggressive B-cell non-Hodgkin lymphomas detected by microarray-based comparative genomic hybridization. *Oncogene* 2003;22:1425-1429.
92. Tagawa H, Tsuzuki S, Suzuki R et al. Genome-wide array-based comparative genomic hybridization of diffuse large B-cell lymphoma: comparison between CD5-positive and CD5-negative cases. *Cancer Res.* 2004;64:5948-5955.
93. Kameoka Y, Tagawa H, Tsuzuki S et al. Contig array CGH at 3p14.2 points to the FRA3B/FHIT common fragile region as the target gene in diffuse large B-cell lymphoma. *Oncogene* 2004;23:9148-9154.

94. Kasugai Y, Tagawa H, Kameoka Y et al. Identification of CCND3 and BYSL as candidate targets for the 6p21 amplification in diffuse large B-cell lymphoma. *Clin.Cancer Res.* 2005;11:8265-8272.
95. Tagawa H, Suguro M, Tsuzuki S et al. Comparison of genome profiles for identification of distinct subgroups of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2005;106:1770-1777.
96. Chen W, Houldsworth J, Olshen AB et al. Array comparative genomic hybridization reveals genomic copy number changes associated with outcome in diffuse large B-cell lymphomas. *Blood* 2006;107:2477-2485.
97. Toujani S, Dessen P, Ithzar N et al. High resolution genome-wide analysis of chromosomal alterations in Burkitt's lymphoma. *PLoS.One.* 2009;4:e7089.
98. Wessendorf S, Barth TF, Viardot A et al. Further delineation of chromosomal consensus regions in primary mediastinal B-cell lymphomas: an analysis of 37 tumor samples using high-resolution genomic profiling (array-CGH). *Leukemia* 2007;21:2463-2469.
99. Dijkman R, Tensen CP, Jordanova ES et al. Array-based comparative genomic hybridization analysis reveals recurrent chromosomal alterations and prognostic parameters in primary cutaneous large B-cell lymphoma. *J.Clin.Oncol.* 2006;24:296-305.
100. Oudejans JJ, van Wieringen WN, Smeets SJ et al. Identification of genes putatively involved in the pathogenesis of diffuse large B-cell lymphomas by integrative genomics. *Genes Chromosomes.Cancer* 2009;48:250-260.
101. Cheung KJ, Shah SP, Steidl C et al. Genome-wide profiling of follicular lymphoma by array comparative genomic hybridization reveals prognostically significant DNA copy number imbalances. *Blood* 2009;113:137-148.
102. Schwaenen C, Viardot A, Berger H et al. Microarray-based genomic profiling reveals novel genomic aberrations in follicular lymphoma which associate with

- patient survival and gene expression status. *Genes Chromosomes.Cancer* 2009;48:39-54.
103. Sanchez-Izquierdo D, Buchonnet G, Siebert R et al. MALT1 is deregulated by both chromosomal translocation and amplification in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 2003;101:4539-4546.
104. de Leeuw RJ, Davies JJ, Rosenwald A et al. Comprehensive whole genome array CGH profiling of mantle cell lymphoma model genomes. *Hum.Mol.Genet.* 2004;13:1827-1837.
105. Tagawa H, Karnan S, Suzuki R et al. Genome-wide array-based CGH for mantle cell lymphoma: identification of homozygous deletions of the proapoptotic gene BIM. *Oncogene* 2005;24:1348-1358.
106. Camps J, Salaverria I, Garcia MJ et al. Genomic imbalances and patterns of karyotypic variability in mantle-cell lymphoma cell lines. *Leuk.Res.* 2006;30:923-934.
107. Mestre-Escorihuela C, Rubio-Moscardo F, Richter JA et al. Homozygous deletions localize novel tumor suppressor genes in B-cell lymphomas. *Blood* 2007;109:271-280.
108. Monni O, Oinonen R, Elonen E et al. Gain of 3q and deletion of 11q22 are frequent aberrations in mantle cell lymphoma. *Genes Chromosomes.Cancer* 1998;21:298-307.
109. Bentz M, Plesch A, Bullinger L et al. t(11;14)-positive mantle cell lymphomas exhibit complex karyotypes and share similarities with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Genes Chromosomes.Cancer* 2000;27:285-294.
110. Martinez-Climent JA, Vizcarra E, Sanchez D et al. Loss of a novel tumor suppressor gene locus at chromosome 8p is associated with leukemic mantle cell lymphoma. *Blood* 2001;98:3479-3482.

111. Bea S, Tort F, Pinyol M et al. BMI-1 gene amplification and overexpression in hematological malignancies occur mainly in mantle cell lymphomas. *Cancer Res.* 2001;61:2409-2412.
112. Allen JE, Hough RE, Goepel JR et al. Identification of novel regions of amplification and deletion within mantle cell lymphoma DNA by comparative genomic hybridization. *Br.J.Haematol.* 2002;116:291-298.
113. Vega F, Cho-Vega JH, Lennon PA et al. Splenic marginal zone lymphomas are characterized by loss of interstitial regions of chromosome 7q, 7q31.32 and 7q36.2 that include the protection of telomere 1 (POT1) and sonic hedgehog (SHH) genes. *Br.J.Haematol.* 2008;142:216-226.
114. Watkins AJ, Huang Y, Ye H et al. Splenic marginal zone lymphoma: characterization of 7q deletion and its value in diagnosis. *J Pathol* 2010;220:461-474.
115. Schmid C, Kirkham N, Diss T, Isaacson PG. Splenic marginal zone cell lymphoma. *Am J Surg.Pathol.* 1992;16:455-466.
116. Isaacson PG, Piris MA, Catovski D. Splenic marginal zone lymphoma. In Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW, eds. *Tumors of Haematopoietic and Lymphoid tissues. WHO Classification of Tumors.* 2001:135-137.
117. Franco V, Florena AM, Iannitto E. Splenic marginal zone lymphoma. *Blood* 2003;101:2464-2472.
118. Arcaini L, Lazzarino M, Colombo N et al. Splenic marginal zone lymphoma: a prognostic model for clinical use. *Blood* 2006;107:4643-4649.
119. Chacon JI, Mollejo M, Munoz E et al. Splenic marginal zone lymphoma: clinical characteristics and prognostic factors in a series of 60 patients. *Blood* 2002;100:1648-1654.

120. Thieblemont C, Felman P, Callet-Bauchu E et al. Splenic marginal-zone lymphoma: a distinct clinical and pathological entity. *Lancet Oncol.* 2003;4:95-103.
121. Iannitto E, Ambrosetti A, Ammatuna E et al. Splenic marginal zone lymphoma with or without villous lymphocytes. Hematologic findings and outcomes in a series of 57 patients. *Cancer* 2004;101:2050-2057.
122. Parry-Jones N, Matutes E, Gruszka-Westwood AM et al. Prognostic features of splenic lymphoma with villous lymphocytes: a report on 129 patients. *Br J Haematol.* 2003;120:759-764.
123. Troussard X, Valensi F, Duchayne E et al. Splenic lymphoma with villous lymphocytes: clinical presentation, biology and prognostic factors in a series of 100 patients. Groupe Francais d'Hematologie Cellulaire (GFHC). *Br J Haematol.* 1996;93:731-736.
124. Iannitto E, Minardi V, Callea V et al. Assessment of the frequency of additional cancers in patients with splenic marginal zone lymphoma. *Eur.J Haematol.* 2006;76:134-140.
125. Camacho FI, Mollejo M, Mateo MS et al. Progression to large B-cell lymphoma in splenic marginal zone lymphoma: a description of a series of 12 cases. *Am J Surg Pathol* 2001;25:1268-1276.
126. Isaacson PG, Matutes E, Burke M, Catovsky D. The histopathology of splenic lymphoma with villous lymphocytes. *Blood* 1994;84:3828-3834.
127. Mollejo M, Menarguez J, Lloret E et al. Splenic marginal zone lymphoma: a distinctive type of low-grade B-cell lymphoma. A clinicopathological study of 13 cases. *Am J Surg.Pathol.* 1995;19:1146-1157.
128. Catovsky D, Matutes E. Splenic lymphoma with circulating villous lymphocytes/splenic marginal-zone lymphoma. *Semin.Hematol.* 1999;36:148-154.

129. Matutes E, Oscier D, Montalban C et al. Splenic marginal zone lymphoma proposals for a revision of diagnostic, staging and therapeutic criteria. *Leukemia* 2008;22:487-495.
130. Matutes E, Morilla R, Owusu-Ankomah K, Houlihan A, Catovsky D. The immunophenotype of splenic lymphoma with villous lymphocytes and its relevance to the differential diagnosis with other B-cell disorders. *Blood* 1994;83:1558-1562.
131. Franco V, Florena AM, Stella M et al. Splenectomy influences bone marrow infiltration in patients with splenic marginal zone cell lymphoma with or without villous lymphocytes. *Cancer* 2001;91:294-301.
132. Audouin J, Le TA, Molina T et al. Patterns of bone marrow involvement in 58 patients presenting primary splenic marginal zone lymphoma with or without circulating villous lymphocytes. *Br J Haematol.* 2003;122:404-412.
133. Giannouli S, Paterakis G, Ziakas PD, Anagnostou D, Voulgarelis M. Splenic marginal zone lymphomas with peripheral CD5 expression. *Haematologica* 2004;89:113-114.
134. Liu H, Ye H, Dogan A et al. T(11;18)(q21;q21) is associated with advanced mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma that expresses nuclear BCL10. *Blood* 2001;98:1182-1187.
135. Papadaki T, Stamatopoulos K, Belessi C et al. Splenic marginal-zone lymphoma: one or more entities? A histologic, immunohistochemical, and molecular study of 42 cases. *Am J Surg Pathol* 2007;31:438-446.
136. Van Huyen JP, Molina T, Delmer A et al. Splenic marginal zone lymphoma with or without plasmacytic differentiation. *Am J Surg Pathol* 2000;24:1581-1592.
137. Franco V, Florena AM, Campesi G. Intrasinusoidal bone marrow infiltration: a possible hallmark of splenic lymphoma. *Histopathology* 1996;29:571-575.

138. Hoyer JD, Li CY, Yam LT, Hanson CA, Kurtin PJ. Immunohistochemical demonstration of acid phosphatase isoenzyme 5 (tartrate-resistant) in paraffin sections of hairy cell leukemia and other hematologic disorders. *Am J Clin.Pathol* 1997;108:308-315.
139. Savilo E, Campo E, Mollejo M et al. Absence of cyclin D1 protein expression in splenic marginal zone lymphoma. *Mod.Pathol* 1998;11:601-606.
140. Lloret E, Mollejo M, Mateo MS et al. Splenic marginal zone lymphoma with increased number of blasts: an aggressive variant? *Hum.Pathol* 1999;30:1153-1160.
141. Mollejo M, Camacho FI, Algara P et al. Nodal and splenic marginal zone B cell lymphomas. *Hematol.Oncol.* 2005;23:108-118.
142. Mollejo M, Algara P, Ruiz-Ballesteros E, Aribas A, Piris MA. Aspectos biológicos del linfoma esplénico de la zona marginal. *haematologica/edición española* 2008;93:105-109.
143. Oscier DG, Matutes E, Gardiner A et al. Cytogenetic studies in splenic lymphoma with villous lymphocytes. *Br J Haematol.* 1993;85:487-491.
144. Hernandez JM, Schoenmakers EF, Dal CP et al. Molecular delineation of the commonly deleted segment in mature B-cell lymphoid neoplasias with deletion of 7q. *Genes Chromosomes.Cancer* 1997;18:147-150.
145. Troussard X, Mauvieux L, Radford-Weiss I et al. Genetic analysis of splenic lymphoma with villous lymphocytes: a Groupe Francais d'Hematologie Cellulaire (GFHC) study. *Br J Haematol.* 1998;101:712-721.
146. Sole F, Salido M, Espinet B et al. Splenic marginal zone B-cell lymphomas: two cytogenetic subtypes, one with gain of 3q and the other with loss of 7q. *Haematologica* 2001;86:71-77.

147. Hernandez JM, Garcia JL, Gutierrez NC et al. Novel genomic imbalances in B-cell splenic marginal zone lymphomas revealed by comparative genomic hybridization and cytogenetics. *Am J Pathol.* 2001;158:1843-1850.
148. Gruszka-Westwood AM, Hamoudi RA, Matutes E, Tuset E, Catovsky D. p53 abnormalities in splenic lymphoma with villous lymphocytes. *Blood* 2001;97:3552-3558.
149. Gazzo S, Baseggio L, Coignet L et al. Cytogenetic and molecular delineation of a region of chromosome 3q commonly gained in marginal zone B-cell lymphoma. *Haematologica* 2003;88:31-38.
150. Callet-Bauchu E, Baseggio L, Felman P et al. Cytogenetic analysis delineates a spectrum of chromosomal changes that can distinguish non-MALT marginal zone B-cell lymphomas among mature B-cell entities: a description of 103 cases. *Leukemia* 2005;19:1818-1823.
151. Salido M, Baro C, Oscier D et al. Cytogenetic aberrations and their prognostic value in a series of 330 splenic marginal zone B-cell lymphomas: a multicenter study of the Splenic B-Cell Lymphoma Group 1. *Blood* 2010
152. Oscier DG, Gardiner A, Mould S. Structural abnormalities of chromosome 7q in chronic lymphoproliferative disorders. *Cancer Genet.Cytogenet.* 1996;92:24-27.
153. Sole F, Woessner S, Florensa L et al. Frequent involvement of chromosomes 1, 3, 7 and 8 in splenic marginal zone B-cell lymphoma. *Br J Haematol.* 1997;98:446-449.
154. Mateo M, Mollejo M, Villuendas R et al. 7q31-32 allelic loss is a frequent finding in splenic marginal zone lymphoma. *Am J Pathol.* 1999;154:1583-1589.
155. Algara P, Mateo MS, Sanchez-Beato M et al. Analysis of the IgV(H) somatic mutations in splenic marginal zone lymphoma defines a group of unmutated cases with frequent 7q deletion and adverse clinical course. *Blood* 2002;99:1299-1304.

156. Boonstra R, Bosga-Bouwer A, van Imhoff GW et al. Splenic marginal zone lymphomas presenting with splenomegaly and typical immunophenotype are characterized by allelic loss in 7q31-32. *Mod.Pathol.* 2003;16:1210-1217.
157. Andersen CL, Gruszka-Westwood A, Atkinson S et al. Recurrent genomic imbalances in B-cell splenic marginal-zone lymphoma revealed by comparative genomic hybridization. *Cancer Genet.Cytogenet.* 2005;156:122-128.
158. Ocio EM, Hernandez JM, Mateo G et al. Immunophenotypic and cytogenetic comparison of Waldenstrom's macroglobulinemia with splenic marginal zone lymphoma. *Clin.Lymphoma* 2005;5:241-245.
159. Baro C, Salido M, Espinet B et al. New chromosomal alterations in a series of 23 splenic marginal zone lymphoma patients revealed by Spectral Karyotyping (SKY). *Leuk.Res.* 2008;32:727-736.
160. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 2000;403:503-511.
161. Rosenwald A, Wright G, Chan WC et al. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *N.Engl.J.Med.* 2002;346:1937-1947.
162. Wright G, Tan B, Rosenwald A et al. A gene expression-based method to diagnose clinically distinct subgroups of diffuse large B cell lymphoma. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2003;100:9991-9996.
163. Said J. Diffuse aggressive B-cell lymphomas. *Adv.Anat.Pathol.* 2009;16:216-235.
164. Barrans SL, Carter I, Owen RG et al. Germinal center phenotype and bcl-2 expression combined with the International Prognostic Index improves patient risk stratification in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2002;99:1136-1143.

165. Chang CC, McClintock S, Cleveland RP et al. Immunohistochemical expression patterns of germinal center and activation B-cell markers correlate with prognosis in diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Surg Pathol* 2004;28:464-470.
166. Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC et al. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood* 2004;103:275-282.
167. Pittaluga S, Ayoubi TA, Wlodarska I et al. BCL-6 expression in reactive lymphoid tissue and in B-cell non-Hodgkin's lymphomas. *J Pathol* 1996;179:145-150.
168. Skinnider BF, Horsman DE, Dupuis B, Gascoyne RD. Bcl-6 and Bcl-2 protein expression in diffuse large B-cell lymphoma and follicular lymphoma: correlation with 3q27 and 18q21 chromosomal abnormalities. *Hum.Pathol.* 1999;30:803-808.
169. Ohshima K, Kawasaki C, Muta H et al. CD10 and Bcl10 expression in diffuse large B-cell lymphoma: CD10 is a marker of improved prognosis. *Histopathology* 2001;39:156-162.
170. McCluggage WG, Catherwood M, Alexander HD et al. Immunohistochemical expression of CD10 and t(14;18) chromosomal translocation may be indicators of follicle centre cell origin in nodal diffuse large B-cell lymphoma. *Histopathology* 2002;41:414-420.
171. Colomo L, Lopez-Guillermo A, Perales M et al. Clinical impact of the differentiation profile assessed by immunophenotyping in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2003;101:78-84.
172. Monni O, Joensuu H, Franssila K et al. BCL2 overexpression associated with chromosomal amplification in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 1997;90:1168-1174.
173. Chaganti RS, Nanjangud G, Schmidt H, Teruya-Feldstein J. Recurring chromosomal abnormalities in non-Hodgkin's lymphoma: biologic and clinical significance. *Semin.Hematol.* 2000;37:396-411.

174. Bloomfield CD, Arthur DC, Frizzera G et al. Nonrandom chromosome abnormalities in lymphoma. *Cancer Res.* 1983;43:2975-2984.
175. Kaneko Y, Rowley JD, Variakojis D et al. Prognostic implications of karyotype and morphology in patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Int.J Cancer* 1983;32:683-692.
176. Levine EG, Arthur DC, Frizzera G et al. Cytogenetic abnormalities predict clinical outcome in non-Hodgkin lymphoma. *Ann.Intern.Med* 1988;108:14-20.
177. Fleischman EW, Prigogina EL, Ilynskaya GW et al. Chromosomal characteristics of malignant lymphoma. *Hum.Genet.* 1989;82:343-348.
178. Yunis JJ, Mayer MG, Arnesen MA et al. bcl-2 and other genomic alterations in the prognosis of large-cell lymphoma. *N.Engl.J Med* 1989;320:1047-1054.
179. Hashimoto K, Miura I, Chyubachi A, Saito M, Miura AB. Correlations of chromosome abnormalities with histologic and immunologic characteristics in 49 patients from Akita, Japan with non-Hodgkin lymphoma. *Cancer Genet.Cytogenet.* 1995;81:56-65.
180. Monni O, Joensuu H, Franssila K, Knuutila S. DNA copy number changes in diffuse large B-cell lymphoma--comparative genomic hybridization study. *Blood* 1996;87:5269-5278.
181. la-Favera R, Ye BH, Lo CF et al. Identification of genetic lesions associated with diffuse large-cell lymphoma. *Ann.Oncol.* 1994;5 Suppl 1:55-60.
182. Baron BW, Nucifora G, McCabe N et al. Identification of the gene associated with the recurring chromosomal translocations t(3;14)(q27;q32) and t(3;22)(q27;q11) in B-cell lymphomas. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1993;90:5262-5266.
183. Miki T, Kawamata N, Arai A et al. Molecular cloning of the breakpoint for 3q27 translocation in B-cell lymphomas and leukemias. *Blood* 1994;83:217-222.

184. Horsman DE, Gascoyne RD, Coupland RW, Coldman AJ, Adomat SA. Comparison of cytogenetic analysis, southern analysis, and polymerase chain reaction for the detection of t(14; 18) in follicular lymphoma. *Am J Clin.Pathol* 1995;103:472-478.
185. Chaganti SR, Rao PH, Chen W et al. Deregulation of BCL6 in non-Hodgkin lymphoma by insertion of IGH sequences in complex translocations involving band 3q27. *Genes Chromosomes.Cancer* 1998;23:328-336.
186. Pasqualucci L, Bereschenko O, Niu H et al. Molecular pathogenesis of non-Hodgkin's lymphoma: the role of Bcl-6. *Leuk.Lymphoma* 2003;44 Suppl 3:S5-12.
187. Bastard C, Deweindt C, Kerckaert JP et al. LAZ3 rearrangements in non-Hodgkin's lymphoma: correlation with histology, immunophenotype, karyotype, and clinical outcome in 217 patients. *Blood* 1994;83:2423-2427.
188. Wlodarska I, Mecucci C, Stul M et al. Fluorescence in situ hybridization identifies new chromosomal changes involving 3q27 in non-Hodgkin's lymphomas with BCL6/LAZ3 rearrangement. *Genes Chromosomes.Cancer* 1995;14:1-7.
189. Dierlamm J, Pittaluga S, Stul M et al. BCL6 gene rearrangements also occur in marginal zone B-cell lymphoma. *Br J Haematol.* 1997;98:719-725.
190. Gaidano G, Pastore C, Volpe G. Molecular pathogenesis of non-Hodgkin lymphoma: a clinical perspective. *Haematologica* 1995;80:454-472.
191. Gascoyne RD, Adomat SA, Krajewski S et al. Prognostic significance of Bcl-2 protein expression and Bcl-2 gene rearrangement in diffuse aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1997;90:244-251.
192. Kramer MH, Hermans J, Wijburg E et al. Clinical relevance of BCL2, BCL6, and MYC rearrangements in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 1998;92:3152-3162.
193. Ladanyi M, Offit K, Jhanwar SC, Filippa DA, Chaganti RS. MYC rearrangement and translocations involving band 8q24 in diffuse large cell lymphomas. *Blood* 1991;77:1057-1063.

194. Offit K, Louie DC, Parsa NZ et al. BCL6 gene rearrangement and other cytogenetic abnormalities in diffuse large cell lymphoma. *Leuk.Lymphoma* 1995;20:85-89.
195. Bernell P, Jacobsson B, Liliemark J et al. Gain of chromosome 7 marks the progression from indolent to aggressive follicle centre lymphoma and is a common finding in patients with diffuse large B-cell lymphoma: a study by FISH. *Br J Haematol.* 1998;101:487-491.
196. Cigudosa JC, Parsa NZ, Louie DC et al. Cytogenetic analysis of 363 consecutively ascertained diffuse large B-cell lymphomas. *Genes Chromosomes.Cancer* 1999;25:123-133.
197. Palanisamy N, bou-Elella AA, Chaganti SR et al. Similar patterns of genomic alterations characterize primary mediastinal large-B-cell lymphoma and diffuse large-B-cell lymphoma. *Genes Chromosomes.Cancer* 2002;33:114-122.
198. Houldsworth J, Mathew S, Rao PH et al. REL proto-oncogene is frequently amplified in extranodal diffuse large cell lymphoma. *Blood* 1996;87:25-29.
199. Rao PH, Houldsworth J, Dyomina K et al. Chromosomal and gene amplification in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 1998;92:234-240.
200. Shipp MA, The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project. A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *N.Engl.J.Med.* 1993;329:987-994.
201. Lossos IS, Morgensztern D. Prognostic biomarkers in diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin.Oncol.* 2006;24:995-1007.
202. Nicolaides C, Fountzilas G, Zoumbos N et al. Diffuse large cell lymphomas: identification of prognostic factors and validation of the International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Index. A Hellenic Cooperative Oncology Group Study. *Oncology* 1998;55:405-415.

203. Wilder RB, Rodriguez MA, Medeiros LJ et al. International prognostic index-based outcomes for diffuse large B-cell lymphomas. *Cancer* 2002;94:3083-3088.
204. Cabanillas F, Pathak S, Grant G et al. Refractoriness to chemotherapy and poor survival related to abnormalities of chromosomes 17 and 7 in lymphoma. *Am J Med* 1989;87:167-172.
205. Schouten HC, Sanger WG, Weisenburger DD, Anderson J, Armitage JO. Chromosomal abnormalities in untreated patients with non-Hodgkin's lymphoma: associations with histology, clinical characteristics, and treatment outcome. The Nebraska Lymphoma Study Group. *Blood* 1990;75:1841-1847.
206. Offit K, Wong G, Filippa DA, Tao Y, Chaganti RS. Cytogenetic analysis of 434 consecutively ascertained specimens of non-Hodgkin's lymphoma: clinical correlations. *Blood* 1991;77:1508-1515.
207. Atkins CD. A predictive model for non-Hodgkin's lymphoma. *N.Engl.J Med* 1994;330:574-575.
208. Shipp MA, Ross KN, Tamayo P et al. Diffuse large B-cell lymphoma outcome prediction by gene-expression profiling and supervised machine learning. *Nat.Med.* 2002;8:68-74.
209. Bai M, Skyrilas A, Agnantis NJ et al. Diffuse large B-cell lymphomas with germinal center B-cell-like differentiation immunophenotypic profile are associated with high apoptotic index, high expression of the proapoptotic proteins bax, bak and bid and low expression of the antiapoptotic protein bcl-xl. *Mod.Pathol* 2004;17:847-856.
210. Huang JZ, Sanger WG, Greiner TC et al. The t(14;18) defines a unique subset of diffuse large B-cell lymphoma with a germinal center B-cell gene expression profile. *Blood* 2002;99:2285-2290.
211. Hill ME, MacLennan KA, Cunningham DC et al. Prognostic significance of BCL-2 expression and bcl-2 major breakpoint region rearrangement in diffuse large cell

- non-Hodgkin's lymphoma: a British National Lymphoma Investigation Study. *Blood* 1996;88:1046-1051.
212. Iqbal J, Neppalli VT, Wright G et al. BCL2 expression is a prognostic marker for the activated B-cell-like type of diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin.Oncol.* 2006;24:961-968.
213. De PP, Achten R, Verhoef G et al. Large cleaved and immunoblastic lymphoma may represent two distinct clinicopathologic entities within the group of diffuse large B-cell lymphomas. *J Clin.Oncol.* 2005;23:7060-7068.
214. Muris JJ, Meijer CJ, Vos W et al. Immunohistochemical profiling based on Bcl-2, CD10 and MUM1 expression improves risk stratification in patients with primary nodal diffuse large B cell lymphoma. *J Pathol* 2006;208:714-723.
215. De PP, De Wolf-Peeters C. Diffuse large B-cell lymphoma: a heterogeneous group of non-Hodgkin lymphomas comprising several distinct clinicopathological entities. *Leukemia* 2007;21:37-43.
216. Fiegler H, Carr P, Douglas EJ et al. DNA microarrays for comparative genomic hybridization based on DOP-PCR amplification of BAC and PAC clones. *Genes Chromosomes.Cancer* 2003;36:361-374.
217. Vermeesch JR, Melotte C, Froyen G et al. Molecular karyotyping: array CGH quality criteria for constitutional genetic diagnosis. *J Histochem.Cytochem.* 2005;53:413-422.
218. Cook JR. Paraffin section interphase fluorescence in situ hybridization in the diagnosis and classification of non-hodgkin lymphomas. *Diagn.Mol.Pathol.* 2004;13:197-206.
219. Carter NP. Methods and strategies for analyzing copy number variation using DNA microarrays. *Nat.Genet.* 2007;39:S16-S21.
220. BAC Glycerol stock cultures. 2009. Ref Type: Internet Communication

221. Fiegler H, Redon R, Carter NP. Construction and use of spotted large-insert clone DNA microarrays for the detection of genomic copy number changes. *Nat.Protoc.* 2007;2:577-587.
222. Affara NA. Resource and hardware options for microarray-based experimentation. *Brief.Funct.Genomic.Proteomic.* 2003;2:7-20.
223. van Beers EH, Joosse SA, Ligtenberg MJ et al. A multiplex PCR predictor for aCGH success of FFPE samples. *Br.J.Cancer* 2006;94:333-337.
224. Bello, Ricardo, Colombini, Mauro, and Takeda, Eugenia. Análisis de datos de microarrays de dos canales. Un acercamiento teórico-práctico. 2007. Ref Type: Personal Communication
225. Qin LX, Kerr KF. Empirical evaluation of data transformations and ranking statistics for microarray analysis. *Nucleic Acids Res.* 2004;32:5471-5479.
226. Vaquerizas, J. M. DN MAD : Diagnosis and Normalization for MicroArray Data (DN MAD). 2005. Ref Type: Generic
227. Kelmansky DM. Normalización. Análisis Exploratorio y Confirmatorio de Datos de Experimentos de Microarrays. 2006:98-108.
228. Yang YH, Dudoit S, Luu P et al. Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation. *Nucleic Acids Res.* 2002;30:e15.
229. Bernardini M, Lee CH, Beheshti B et al. High-resolution mapping of genomic imbalance and identification of gene expression profiles associated with differential chemotherapy response in serous epithelial ovarian cancer. *Neoplasia.* 2005;7:603-613.
230. Lambros MB, Fiegler H, Jones A et al. Analysis of ovarian cancer cell lines using array-based comparative genomic hybridization. *J.Pathol.* 2005;205:29-40.

231. Lapuk A, Volik S, Vincent R et al. Computational BAC clone contig assembly for comprehensive genome analysis. *Genes Chromosomes.Cancer* 2004;40:66-71.
232. Wang K, Li J, Li S, Bolund L, Wiuf C. Estimation of tumor heterogeneity using CGH array data. *BMC.Bioinformatics*. 2009;10:12.
233. Olshen AB, Venkatraman ES, Lucito R, Wigler M. Circular binary segmentation for the analysis of array-based DNA copy number data. *Biostatistics*. 2004;5:557-572.
234. Domenech-Sanchez A, Vila J. [Basis, types and application of DNA arrays in clinical microbiology]. *Enferm.Infecc.Microbiol.Clin*. 2004;22:46-54.
235. Schwaenen C, Nessling M, Wessendorf S et al. Automated array-based genomic profiling in chronic lymphocytic leukemia: development of a clinical tool and discovery of recurrent genomic alterations. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2004;101:1039-1044.
236. O'Shea D, O'Riain C, Gupta M et al. Regions of acquired uniparental disomy at diagnosis of follicular lymphoma are associated with both overall survival and risk of transformation. *Blood* 2009;113:2298-2301.
237. Fukuhara N, Tagawa H, Kameoka Y et al. Characterization of target genes at the 2p15-16 amplicon in diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer Sci*. 2006;97:499-504.
238. Dierlamm J, Rosenberg C, Stul M et al. Characteristic pattern of chromosomal gains and losses in marginal zone B cell lymphoma detected by comparative genomic hybridization. *Leukemia* 1997;11:747-758.
239. Thorns C, Bastian B, Pinkel D et al. Chromosomal aberrations in angioimmunoblastic T-cell lymphoma and peripheral T-cell lymphoma unspecified: A matrix-based CGH approach. *Genes Chromosomes.Cancer* 2007;46:37-44.
240. Barth TF, Dohner H, Werner CA et al. Characteristic pattern of chromosomal gains and losses in primary large B-cell lymphomas of the gastrointestinal tract. *Blood* 1998;91:4321-4330.

241. Chan WY, Wong N, Chan AB, Chow JH, Lee JC. Consistent copy number gain in chromosome 12 in primary diffuse large cell lymphomas of the stomach. *Am J Pathol.* 1998;152:11-16.
242. Brynes RK, Almaguer PD, Leathery KE et al. Numerical cytogenetic abnormalities of chromosomes 3, 7, and 12 in marginal zone B-cell lymphomas. *Mod.Pathol.* 1996;9:995-1000.
243. Dierlamm J, Michaux L, Wlodarska I et al. Trisomy 3 in marginal zone B-cell lymphoma: a study based on cytogenetic analysis and fluorescence in situ hybridization. *Br J Haematol.* 1996;93:242-249.
244. Wotherspoon AC, Finn TM, Isaacson PG. Trisomy 3 in low-grade B-cell lymphomas of mucosa-associated lymphoid tissue. *Blood* 1995;85:2000-2004.
245. Aamot HV, Micci F, Holte H, Delabie J, Heim S. G-banding and molecular cytogenetic analyses of marginal zone lymphoma. *Br J Haematol.* 2005;130:890-901.
246. Dierlamm J, Wlodarska I, Michaux L et al. Genetic abnormalities in marginal zone B-cell lymphoma. *Hematol.Oncol.* 2000;18:1-13.
247. Barrans SL, O'Connor SJ, Evans PA et al. Rearrangement of the BCL6 locus at 3q27 is an independent poor prognostic factor in nodal diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol.* 2002;117:322-332.
248. Ohno H. Pathogenetic and clinical implications of non-immunoglobulin; BCL6 translocations in B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin.Exp.Hematop.* 2006;46:43-53.
249. Tselepis C, Chidgey M, North A, Garrod D. Desmosomal adhesion inhibits invasive behavior. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1998;95:8064-8069.
250. Oshiro MM, Kim CJ, Wozniak RJ et al. Epigenetic silencing of DSC3 is a common event in human breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2005;7:R669-R680.

251. Knutsen T. Cytogenetic changes in the progression of lymphoma. *Leuk.Lymphoma* 1998;31:1-19.
252. Stilgenbauer S, Bullinger L, Lichter P, Dohner H. Genetics of chronic lymphocytic leukemia: genomic aberrations and V(H) gene mutation status in pathogenesis and clinical course. *Leukemia* 2002;16:993-1007.
253. Oscier D, Owen R, Johnson S. Splenic marginal zone lymphoma. *Blood* 2005;19:39-51.
254. Noben-Trauth K, Copeland NG, Gilbert DJ et al. Mybl2 (Bmyb) maps to mouse chromosome 2 and human chromosome 20q 13.1. *Genomics* 1996;35:610-612.
255. Shikano T, Kaneko Y, Ishikawa Y et al. Ph1-positive and Ph1-negative abnormal cell lines in a child with lymphoblastic lymphoma. *Br J Haematol.* 1984;58:459-464.
256. Hernandez JM, Mecucci C, Criel A et al. Cytogenetic analysis of B cell chronic lymphoid leukemias classified according to morphologic and immunophenotypic (FAB) criteria. *Leukemia* 1995;9:2140-2146.
257. Corcoran MM, Mould SJ, Orchard JA et al. Dysregulation of cyclin dependent kinase 6 expression in splenic marginal zone lymphoma through chromosome 7q translocations. *Oncogene* 1999;18:6271-6277.
258. Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat.Rev.Cancer* 2006;6:857-866.
259. Kufe DW. Mucins in cancer: function, prognosis and therapy. *Nat.Rev.Cancer* 2009;9:874-885.
260. Duraisamy S, Ramasamy S, Kharbanda S, Kufe D. Distinct evolution of the human carcinoma-associated transmembrane mucins, MUC1, MUC4 AND MUC16. *Gene* 2006;373:28-34.

261. Ueda Y, Su Y, Richmond A. CCAAT displacement protein regulates nuclear factor-kappa beta-mediated chemokine transcription in melanoma cells. *Melanoma Res.* 2007;17:91-103.
262. Zeng WR, Scherer SW, Koutsilieris M et al. Loss of heterozygosity and reduced expression of the CUTL1 gene in uterine leiomyomas. *Oncogene* 1997;14:2355-2365.
263. Neville PJ, Thomas N, Campbell IG. Loss of heterozygosity at 7q22 and mutation analysis of the CDP gene in human epithelial ovarian tumors. *Int.J.Cancer* 2001;91:345-349.
264. Sato K, Takeuchi T, Kukimoto I et al. Human papillomavirus type 16 P670 promoter is negatively regulated by CCAAT displacement protein. *Virus Genes* 2007;35:473-481.
265. Narahari J, Fisk JC, Melendy T, Roman A. Interactions of the cellular CCAAT displacement protein and human papillomavirus E2 protein with the viral origin of replication can regulate DNA replication. *Virology* 2006;350:302-311.
266. Michl P, Ramjaun AR, Pardo OE et al. CUTL1 is a target of TGF(beta) signaling that enhances cancer cell motility and invasiveness. *Cancer Cell* 2005;7:521-532.
267. Michl P, Knobel B, Downward J. CUTL1 is phosphorylated by protein kinase A, modulating its effects on cell proliferation and motility. *J.Biol.Chem.* 2006;281:15138-15144.
268. Zeng WR, Watson P, Lin J et al. Refined mapping of the region of loss of heterozygosity on the long arm of chromosome 7 in human breast cancer defines the location of a second tumor suppressor gene at 7q22 in the region of the CUTL1 gene. *Oncogene* 1999;18:2015-2021.
269. Ripka S, Konig A, Buchholz M et al. WNT5A--target of CUTL1 and potent modulator of tumor cell migration and invasion in pancreatic cancer. *Carcinogenesis* 2007;28:1178-1187.

270. Goulet B, Markovic Y, Leduy L, Nepveu A. Proteolytic processing of cut homeobox 1 by neutrophil elastase in the MV4;11 myeloid leukemia cell line. *Mol.Cancer Res.* 2008;6:644-653.
271. De VJ, Thykjaer T, Tarte K et al. Comparison of gene expression profiling between malignant and normal plasma cells with oligonucleotide arrays. *Oncogene* 2002;21:6848-6857.
272. Sinclair AM, Lee JA, Goldstein A et al. Lymphoid apoptosis and myeloid hyperplasia in CCAAT displacement protein mutant mice. *Blood* 2001;98:3658-3667.
273. Hindersin S, Niemeyer CM, Germing U, Gobel U, Kratz CP. Mutation analysis of CUTL1 in childhood myeloid neoplasias with monosomy 7. *Leuk.Res.* 2007;31:1323-1324.
274. Pal S, Baiocchi RA, Byrd JC et al. Low levels of miR-92b/96 induce PRMT5 translation and H3R8/H4R3 methylation in mantle cell lymphoma. *EMBO J.* 2007;26:3558-3569.
275. Futterer A, Campanero MR, Leonardo E et al. Dido gene expression alterations are implicated in the induction of hematological myeloid neoplasms. *J.Clin.Invest* 2005;115:2351-2362.
276. Rodriguez J, Caballero MD, Gutierrez A et al. Autologous stem-cell transplantation in diffuse large B-cell non-Hodgkin's lymphoma not achieving complete response after induction chemotherapy: the GEL/TAMO experience. *Ann.Oncol.* 2004;15:1504-1509.
277. Arranz R, Conde E, Grande C et al. Dose-escalated CHOP and tailored intensification with IFE according to early response and followed by BEAM/autologous stem-cell transplantation in poor-risk aggressive B-cell lymphoma: a prospective study from the GEL-TAMO Study Group. *Eur.J Haematol.* 2008

278. Kaplan E, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc* 1958;53:457-481.
279. Peto R, Pike MC, Armitage P. Design and analysis of randomized clinical trials requiring prolonged observation of each patient. II. Analysis and Examples. *Br J Cancer* 1977;35:1-39.
280. Cox DR. Regression models and life-tables. *J R Stat Soc* 1972;34:187.
281. Abubaker J, Bavi PP, Al-Harbi S et al. PIK3CA mutations are mutually exclusive with PTEN loss in diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia* 2007;21:2368-2370.
282. Fridberg M, Servin A, Anagnostaki L et al. Protein expression and cellular localization in two prognostic subgroups of diffuse large B-cell lymphoma: Higher expression of ZAP70 and PKC-beta II in the non-germinal center group and poor survival in patients deficient in nuclear PTEN. *Leuk.Lymphoma* 2007;48:2221-2232.
283. Uddin S, Hussain AR, Siraj AK et al. Role of phosphatidylinositol 3'-kinase/AKT pathway in diffuse large B-cell lymphoma survival. *Blood* 2006;108:4178-4186.
284. Feuerhake F, Kutok JL, Monti S et al. NFkappaB activity, function, and target-gene signatures in primary mediastinal large B-cell lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma subtypes. *Blood* 2005;106:1392-1399.
285. Houldsworth J, Olshen AB, Cattoretti G et al. Relationship between REL amplification, REL function, and clinical and biologic features in diffuse large B-cell lymphomas. *Blood* 2004;103:1862-1868.
286. Joos S, Otano-Joos MI, Ziegler S et al. Primary mediastinal (thymic) B-cell lymphoma is characterized by gains of chromosomal material including 9p and amplification of the REL gene. *Blood* 1996;87:1571-1578.

287. Barth TF, Martin-Subero JI, Joos S et al. Gains of 2p involving the REL locus correlate with nuclear c-Rel protein accumulation in neoplastic cells of classical Hodgkin lymphoma. *Blood* 2003;101:3681-3686.
288. Joos S, Menz CK, Wrobel G et al. Classical Hodgkin lymphoma is characterized by recurrent copy number gains of the short arm of chromosome 2. *Blood* 2002;99:1381-1387.
289. Satterwhite E, Sonoki T, Willis TG et al. The BCL11 gene family: involvement of BCL11A in lymphoid malignancies. *Blood* 2001;98:3413-3420.
290. Takeuchi I, Tagawa H, Tsujikawa A et al. The potential of copy number gains and losses, detected by array-based comparative genomic hybridization, for computational differential diagnosis of B-cell lymphomas and genetic regions involved in lymphomagenesis. *Haematologica* 2009;94:61-69.
291. Campo, E. Insights from Expression Arrays and Genomic Profiling of Aggressive B-Cell Lymphoma. 2009. Ref Type: Personal Communication
292. Bea S, Zettl A, Wright G et al. Diffuse large B-cell lymphoma subgroups have distinct genetic profiles that influence tumor biology and improve gene-expression-based survival prediction. *Blood* 2005;106:3183-3190.

APÉNDICES

Apéndice 1

Anexo I

NEOPLASIAS DE CELULAS B MADURAS

LEUCEMIA LINFÁTICA CRÓNICA/LINFOMA LINFOCITICO BIEN DIFERENCIADO
LEUCEMIA PROLINFOCITICA
LINFOMA ESPLENICO MARGINAL (LINFOCITOS VELLOSO)
LEUCEMIA DE CELULAS PELUDAS
LINFOMA/LEUCEMIA ESPLENICO INCLASIFICABLE (PROVISIONAL)
 LINFOMA ESPLENICO DE LINFOCITOS PEQUEÑOS DE LA PULPA ROJA (PROVISIONAL)
 LEUCEMIA VARIANTE DE CELULAS PELUDAS (PROVISIONAL)
LINFOMA LINFOPLASMATICICO
MACROGLOBULINEMIA DE WALDENSTRÖM
ENFERMEDAD DE LAS CADENAS PESADAS (ALFA, GAMMA, MU)
MIELOMA
PLASMOCITOMA OSEO SOLITARIO
PLASMOCITOMA EXTRAOSEO
LINFOMA DE ZONA MARGINAL EXTRANODAL (MALT)
LINFOMA DE ZONA MARGINAL NODAL
LINFOMA DE ZONA MARGINAL NODAL PEDIATRICO (PROVISIONAL)
LINFOMA FOLICULAR
LINFOMA FOLICULAR PEDIATRICO (PROVISIONAL)
LINFOMA CUTANEO PRIMARIO CENTROFOLICULAR
LINFOMA DE CELULAS DEL MANTO
LINFOMA DE CELULAS B GRANDES DIFUSO, NO ESPECIFICADO
 LINFOMA CELULAS GRANDES B RICO EN CELULAS T/HISTIOCITOS
 LINFOMA DE CELULAS GRANDES PRIMARIO DE SNC
 LINFOMA DE CELULAS GRANDES CUTANEO PRIMARIO, DE EXTREMIDADES
 LINFOMA DE CELULAS GRANDES EBV+ DEL ANCIANO (PROVISIONAL)
LINFOMA DIFUSO DE CELULAS GRANDES ASOCIADO CON INFLAMACION CRONICA
GRANULOMATOSIS LINFOMATOIDE
LINFOMA DE CELULAS GRANDES B MEDIASTINICO PRIMARIO (TIMICO)
LINFOMA DE CELULAS GRANDES INTRAVASCULAR
LINFOMA DE CELULAS GRANDES B ALK+
LINFOMA PLASMABLASTICO
LINFOMA DE CELULAS GRANDES B EN ENFERMEDAD DE CASTLEMAN MULTICENTRICA (HHV8)
LINFOMA PRIMARIO DE CAVIDADES
LINFOMA BURKITT
LINFOMA B, INCLASIFICABLE, CON CARACTERES INTERMEDIOS ENTRE LINFOMA DIFUSO DE CELULAS GRANDES B Y LINFOMA DE BURKITT.
LINFOMA B, INCLASIFICABLE, CON CARACTERES INTERMEDIOS ENTRE LINFOMA DIFUSO DE CELULAS GRANDES B Y LINFOMA DE HODGKIN CLASICO.

NEOPLASIAS DE CELULAS T y NK MADURAS

LEUCEMIA PROLIFOCITICA T
LEUCEMIA T DE LINFOCITOS GRANDES GRANULARES
ENFERMEDAD LINFOPROLIFERATIVA CRONICA DE CELULAS NK (PROVISIONAL)
LEUCEMIA DE CELULAS NK AGRESIVA
ENFERMEDAD LINFOPROLIFERATIVA DE CELULAS T SISTEMICA EBV+ DE LA INFANCIA
LINFOMA VACCINIFORME-LIKE
LEUCEMIA/LINFOMA T ADULTO
LINFOMA EXTRANODAL NK/T (NASAL)
LINFOMA DE CELULAS T ASOCIADO A ENTEROPATIA
LINFOMA DE CELULAS T HEPATOESPLENICO
LINFOMA DE CELULAS T PANICULITIS SUBCUTÁNEA
MICOSIS FUNGOIDE
SINDROME DE SEZARY
ENFERMEDAD LINFOPROLIFERATIVA DE CELULA T PRIMARIA CUTANEA CD30+
 PAPULOSIS LINFOMATOIDE
 LINFOMA ANAPLASICO DE CELULAS GRANDES CUTÁNEO PRIMARIO
LINFOMA DE CELULAS T CUTÁNEO PRIMARIO GAMMA-DELTA
LINFOMA CUTÁNEO PRIMARIO CD8+ AGRESIVO CITOTOXICO EPIDERMOTROPICO
(PROVISIONAL)
LINFOMA PRIMARIO CUTANEO CD4+ DE CELULAS T PEQUEÑAS/MEDIANAS (PROVISIONAL)
LINFOMA T PERIFÉRICO, NO ESPECIFICADO
LINFOMA DE CELULAS T ANGIOINMUNOBLASTICO
LINFOMA ANAPLASICO DE CELULAS GRANDES, ALK+
LINFOMA ANAPLASICO DE CELULAS GRANDES, ALK- (PROVISIONAL)

LINFOMA DE HODGKIN

LINFOMA DE HODGKIN NODULAR DE PREDOMINIO LINFOCÍTICO
LINFOMA DE HODGKIN CLÁSICO
 ESCLEROSIS NODULAR
 CELULARIDAD MIXTA
 RICO EN LINFOCITOS
 DEPLECIÓN LINFOIDE

ENFERMEDAD LINFOPROLIFERATIVA POSTTRASPLANTE (PTLD)

LESIONES TEMPRANAS
HIPERPLASIA PLASMACITICA
PTLD INFECCIONSA MONONUCLEOSIS-LIKE
PTLD POLIMORFICO
PTLD MONOMORFICO (CORRESPONDIENTE A LOS TIPOS DE CELULAS B Y T/NK)
PTLD TIPO LINFOMA DE HODGKIN CLASICO

Anexo II

El anexo II se incluye en el CD adjunto. En este anexo se describen todos los clones de la librería “*IMb clone set*” cedida por el Dr Nigel Carter del “*Wellcome Trust Sanger Institute*” de Cambridge, Inglaterra; las placas y el cromosoma al que pertenecen además de la posición en la que localizan dentro del cromosoma.

Anexo III

Clones repetidos en dos placas de la librería *IMb clone set*, *The Wellcome Trust Sanger Institute*, Cambridge, Inglaterra.

Nombre internacional	Placa	Pocillo	Placa	Pocillo
RP11-19N21	Cáncer 1	A 3	NONSC 2	D 6
RP11-445L6	Cáncer 1	G 1	Cáncer 4	A 9
RP11-1A1	NONSC 1	A 1	NONSC 40	A 1
RP11-3J1	NONSC 1	C 7	NONSC 40	A 3
RP11-5G23	NONSC 1	D 9	NONSC 40	A 5
RP11-10E6	NONSC 1	F 8	NONSC 40	A 7
RP11-11F23	NONSC 1	G 6	NONSC 40	A 8
RP11-11G4	NONSC 1	G 7	NONSC 40	A 9
RP11-11G20	NONSC 1	G 8	NONSC 40	A 10
RP11-17L8	NONSC 2	C 7	NONSC 40	B 4
RP11-19F9	NONSC 2	D 3	NONSC 40	B 5
RP11-20N7	NONSC 2	D 11	NONSC 40	B 7
RP11-21B14	NONSC 2	E 1	NONSC 40	B 9
RP11-21C11	NONSC 2	E 4	NONSC 40	B 11
RP11-23M2	NONSC 2	G 3	NONSC 40	C 7
RP11-24P18	NONSC 2	H 6	NONSC 40	C 8
RP11-26L4	NONSC 3	A 7	NONSC 40	C 9
RP11-26L18	NONSC 3	A 9	NONSC 40	C 10
RP11-27P2	NONSC 3	B 5	NONSC 40	C 12
RP11-28E24	NONSC 3	B 6	NONSC 40	D 1
RP11-28I9	NONSC 3	B 8	NONSC 40	D 2
RP11-28L18	NONSC 3	B 9	NONSC 40	D 4
RP11-31O11	NONSC 3	C 6	NONSC 40	D 7
RP11-34L4	NONSC 3	C 12	NONSC 40	D 8
RP11-52C8	NONSC 3	H 12	NONSC 40	D 10
RP11-54I20	NONSC 4	A 3	NONSC 43	B 3
RP11-77N9	NONSC 4	G 3	NONSC 40	E 1
RP11-81E19	NONSC 4	H 1	NONSC 40	E 2
RP11-84G22	NONSC 4	H 10	NONSC 40	E 3
RP11-86O17	NONSC 5	A 1	NONSC 40	E 4
RP11-91K8	NONSC 5	C 8	NONSC 40	E 5
RP11-99C10	NONSC 5	E 7	NONSC 40	E 6
RP11-106F1	NONSC 5	G 4	NONSC 40	E 8
RP11-112J1	NONSC 6	A 2	NONSC 40	E 9
RP11-121L11	NONSC 6	C 11	NONSC 40	E 10
RP11-127B1	NONSC 6	E 3	NONSC 40	E 12
RP11-134C18	NONSC 6	F 3	NONSC 40	F 1
RP11-140G18	NONSC 6	G 4	NONSC 40	F 2
RP11-150C16	NONSC 7	A 5	NONSC 40	F 8
RP11-152P23	NONSC 7	B 1	NONSC 40	F 9
RP11-168E17	NONSC 7	E 4	NONSC 40	F 10
RP11-168K7	NONSC 7	E 6	NONSC 40	F 11
RP11-179O11	NONSC 7	G 10	NONSC 40	G 1
RP11-186F10	NONSC 7	H 6	NONSC 40	G 2
RP11-189H19	NONSC 7	H 11	NONSC 40	G 3
RP11-190J23	NONSC 7	H 12	NONSC 40	G 4
RP11-197P20	NONSC 8	A 10	NONSC 40	G 5
RP11-198G24	NONSC 8	A 11	NONSC 40	G 6
RP11-201J10	NONSC 8	B 3	NONSC 40	G 7
RP11-204J18	NONSC 8	B 12	NONSC 40	G 8
RP11-209H21	NONSC 8	D 4	NONSC 40	G 9
RP11-213G21	NONSC 8	D 12	NONSC 40	G 11
RP11-221G19	NONSC 8	F 7	NONSC 40	H 1
RP11-227P3	NONSC 8	G 4	NONSC 40	H 2
RP11-233C13	NONSC 8	H 4	NONSC 40	H 3
RP11-242D9	NONSC 9	A 11	NONSC 40	H 4
RP11-247H16	NONSC 9	B 6	NONSC 40	H 7
RP11-248B13	NONSC 9	B 7	NONSC 40	H 8
RP11-257N21	NONSC 9	C 12	NONSC 40	H 9
RP11-257P13	NONSC 9	D 1	NONSC 40	H 10
RP11-263G22	NONSC 9	E 4	NONSC 40	H 11
RP11-269I24	NONSC 9	F 8	NONSC 40	H 12
RP11-282B13	NONSC 9	H 3	NONSC 41	A 4
RP11-283C7	NONSC 9	H 6	NONSC 41	A 5
RP11-283E7	NONSC 9	H 7	NONSC 41	A 6
RP11-283F6	NONSC 9	H 8	NONSC 41	A 7
RP11-283I17	NONSC 9	H 9	NONSC 41	A 9
RP11-287F9	NONSC 10	A 7	NONSC 41	A 10

Continuación anexo III

Nombre internacional	Placa	Pocillo	Placa	Pocillo
RP11-296G16	NONSC 10	C 2	NONSC 41	A 11
RP11-296I10	NONSC 10	C 3	NONSC 41	A 12
RP11-298C15	NONSC 10	C 9	NONSC 41	B 1
RP11-303E16	NONSC 10	E 1	NONSC 41	B 5
RP11-303I4	NONSC 10	E 2	NONSC 41	B 6
RP11-304A10	NONSC 10	E 3	NONSC 41	B 7
RP11-304A15	NONSC 10	E 4	NONSC 41	B 8
RP11-310I24	NONSC 10	F 4	NONSC 41	B 9
RP11-311K2	NONSC 10	F 6	NONSC 41	B 11
RP11-312C1	NONSC 10	F 8	NONSC 41	B 12
RP11-314L11	NONSC 10	G 2	NONSC 41	C 1
RP11-315M18	NONSC 10	G 5	NONSC 41	C 2
RP11-315O17	NONSC 10	G 7	NONSC 41	C 3
RP11-321B9	NONSC 10	H 5	NONSC 41	C 4
RP11-327H5	NONSC 11	A 10	NONSC 41	C 6
RP11-329I5	NONSC 11	B 5	NONSC 41	C 8
RP11-333I20	NONSC 11	B 12	NONSC 41	C 9
RP11-343C9	NONSC 11	D 8	NONSC 41	C 10
RP11-344L6	NONSC 11	D 12	NONSC 41	C 11
RP11-348A21	NONSC 11	E 5	NONSC 41	C 12
RP11-348J6	NONSC 11	E 6	NONSC 41	D 1
RP11-349D24	NONSC 11	E 7	NONSC 41	D 2
RP11-350K6	NONSC 11	E 12	NONSC 41	D 3
RP11-353B9	NONSC 11	F 4	NONSC 41	D 4
RP11-354C17	NONSC 11	F 5	NONSC 41	D 6
RP11-353O11	NONSC 11	F 6	NONSC 41	D 5
RP11-354H17	NONSC 11	F 7	NONSC 41	D 7
RP11-355I13	NONSC 11	F 9	NONSC 41	D 8
RP11-355K3	NONSC 11	F 10	NONSC 41	D 9
RP11-355L4	NONSC 11	F 11	NONSC 41	D 10
RP11-356B18	NONSC 11	F 12	NONSC 41	D 11
RP11-356F24	NONSC 11	G 1	NONSC 41	E 1
RP11-356M23	NONSC 11	G 2	NONSC 41	E 2
RP11-357N13	NONSC 11	G 4	NONSC 41	E 3
RP11-358A10	NONSC 11	G 5	NONSC 41	E 4
RP11-361H10	NONSC 11	G 12	NONSC 41	E 5
RP11-361M10	NONSC 11	H 2	NONSC 41	E 6
RP11-362A9	NONSC 11	H 4	NONSC 41	E 7
RP11-362K14	NONSC 11	H 7	NONSC 41	E 8
RP11-363D14	NONSC 11	H 8	NONSC 41	E 9
RP11-364L4	NONSC 11	H 12	NONSC 41	E 11
RP11-364P2	NONSC 12	A 1	NONSC 41	E 12
RP11-365H22	NONSC 12	A 3	NONSC 41	F 1
RP11-368K8	NONSC 12	A 8	NONSC 41	F 2
RP11-372A6	NONSC 12	B 4	NONSC 41	F 3
RP11-375D9	NONSC 12	B 10	NONSC 41	F 5
RP11-387C17	NONSC 12	D 6	NONSC 41	F 7
RP11-413M10	NONSC 12	H 9	NONSC 41	F 10
RP11-417P24	NONSC 13	A 9	NONSC 41	F 11
RP11-424L2	NONSC 13	C 8	NONSC 41	F 12
RP11-425D6	NONSC 13	C 11	NONSC 41	G 1
RP11-425F6	NONSC 13	C 12	NONSC 41	G 2
RP11-427F22	NONSC 13	D 3	NONSC 41	G 3
RP11-436L21	NONSC 13	E 8	NONSC 41	G 5
RP11-437N10	NONSC 13	E 10	NONSC 41	G 6
RP11-443I3	NONSC 13	F 12	NONSC 41	G 7
RP11-452G23	NONSC 13	H 5	NONSC 41	G 8
RP11-458J18	NONSC 14	A 1	NONSC 41	G 9
RP11-463J10	NONSC 14	A 9	NONSC 41	G 10
RP11-463M14	NONSC 14	A 10	NONSC 41	G 11
RP11-474N8	NONSC 14	B 12	NONSC 41	G 12
RP11-477P16	NONSC 14	C 2	NONSC 41	H 1
RP11-478H3	NONSC 14	C 3	NONSC 41	H 2
RP11-481C4	NONSC 14	D 1	NONSC 41	H 3
RP11-481J2	NONSC 14	D 3	NONSC 41	H 4
RP11-483P21	NONSC 14	D 10	NONSC 41	H 5
RP11-484I19	NONSC 14	D 12	NONSC 41	H 6
RP11-496C3	NONSC 14	G 2	NONSC 41	H 7

Continuación anexo III

Nombre internacional	Placa	Pocillo	Placa	Pocillo
RP11-500A9	NONSC 14	G 7	NONSC 41	H 8
RP11-505G12	NONSC 15	A 1	NONSC 41	H 9
RP11-515O17	NONSC 15	B 12	NONSC 41	H 10
RP11-520O10	NONSC 15	C 8	NONSC 41	H 11
RP11-525L23	NONSC 15	D 6	NONSC 41	H 12
RP11-531F16	NONSC 15	E 8	NONSC 42	A 1
RP11-534H15	NONSC 15	F 2	NONSC 42	A 2
RP11-534J17	NONSC 15	F 3	NONSC 42	A 3
RP11-542I3	NONSC 15	G 9	NONSC 42	A 4
RP11-547F18	NONSC 15	H 4	NONSC 42	A 5
RP11-548D17	NONSC 15	H 6	NONSC 42	A 7
RP11-550M19	NONSC 16	A 1	NONSC 42	A 8
RP11-551O2	NONSC 16	A 4	NONSC 42	A 9
RP11-552A14	NONSC 16	A 5	NONSC 42	A 10
RP11-557N21	NONSC 16	B 4	NONSC 42	A 11
RP11-560I19	NONSC 16	B 10	NONSC 42	A 12
RP11-563B11	NONSC 16	C 3	NONSC 42	B 1
RP11-567M21	NONSC 16	C 12	NONSC 42	B 2
RP11-1J4	NONSC 27	A 1	NONSC 40	A 2
RP11-12J5	NONSC 27	B 4	NONSC 40	A 11
RP11-13H10	NONSC 27	B 5	NONSC 40	A 12
RP11-15G6	NONSC 27	B 9	NONSC 40	B 1
RP11-16D24	NONSC 27	B 12	NONSC 40	B 2
RP11-17I10	NONSC 27	C 2	NONSC 40	B 3
RP11-20F20	NONSC 27	C 8	NONSC 40	B 6
RP11-28I21	NONSC 27	D 8	NONSC 40	D 3
RP11-28P24	NONSC 27	D 9	NONSC 40	D 6
RP11-57I6	NONSC 27	E 8	NONSC 40	D 11
RP11-66M18	NONSC 27	F 1	NONSC 40	D 12
RP11-104F14	NONSC 27	G 5	NONSC 43	C 1
RP11-126C19	NONSC 27	H 6	NONSC 40	E 11
RP11-140H23	NONSC 27	H 9	NONSC 40	F 3
RP11-142A12	NONSC 27	H 12	NONSC 40	F 5
RP11-144K9	NONSC 28	A 1	NONSC 40	F 6
RP11-209I11	NONSC 28	B 12	NONSC 40	G 10
RP11-214M24	NONSC 28	C 2	NONSC 40	G 12
RP11-243P9	NONSC 28	D 1	NONSC 40	H 5
RP11-245K4	NONSC 28	D 2	NONSC 40	H 6
RP11-275K4	NONSC 28	E 4	NONSC 41	A 1
RP11-283I3	NONSC 28	E 6	NONSC 41	A 8
RP11-298M15	NONSC 28	E 10	NONSC 41	B 2
RP11-298P6	NONSC 28	E 11	NONSC 41	B 3
RP11-300J18	NONSC 28	E 12	NONSC 41	B 4
RP11-311I10	NONSC 28	F 2	NONSC 41	B 10
RP11-321F20	NONSC 28	F 9	NONSC 41	C 5
RP11-323F16	NONSC 28	F 11	NONSC 43	F 4
RP11-328M22	NONSC 28	G 1	NONSC 41	C 7
RP11-356D23	NONSC 28	H 1	NONSC 41	D 12
RP11-364C6	NONSC 28	H 2	NONSC 41	E 10
RP11-374E21	NONSC 28	H 4	NONSC 41	F 4
RP11-382A21	NONSC 28	H 5	NONSC 41	F 6
RP11-436F9	NONSC 29	B 10	NONSC 41	G 4
RP11-547G15	NONSC 29	F 2	NONSC 42	A 6
RP11-509	NONSC 32	A 1	NONSC 40	A 6
RP11-21N8	NONSC 32	C 5	NONSC 40	C 5
RP11-277E18	NONSC 32	E 6	NONSC 43	E 7
RP11-279K24	NONSC 32	E 9	NONSC 41	A 2
RP11-280K20	NONSC 32	E 12	NONSC 41	A 3
RP11-411B10	NONSC 32	G 6	NONSC 41	F 9
RP11-20O22	NONSC 34	A 2	NONSC 40	B 8
RP11-105C19	NONSC 34	A 4	NONSC 40	E 7
RP11-144O23	NONSC 36	A 1	NONSC 40	F 7
RP11-28M9	NONSC 38	A 4	NONSC 40	D 5
RP11-397E9	NONSC 38	B 4	NONSC 41	F 8
RP11-141F2	NONSC 38	B 9	NONSC 40	F 4
RP11-174I14	NONSC 28	B 3	NONSC 40	F 12
RP11-174I14	NONSC 43	D 6		

Apéndice 2

(Publicaciones y Patentes)

Publicaciones

Autores (por orden de firma): López-Villar O, García JL, Sánchez-Guijo FM, **Robledo C**, Villarón EM, Hernández-Campo P, López-Holgado N, Diez-Campelo M, Barbado MV, Pérez-Simon JA, Hernández-Rivas JM, San-Miguel JF, del Cañizo MC.

Título: “Both expanded and uncultured mesenchymal stem cells from MDS patients are genomically abnormal, showing a specific genetic profile for the 5q- syndrome”.

Revista: Leukemia. 2009 Apr; 23(4):664-72. PMID: 19151777

Autores (por orden de firma): Pérez-Mancera PA, González-Herrero I, Maclean K, Turner AM, Yip MY, Sánchez-Martín M, García JL, **Robledo C**, Flores T, Gutiérrez-Adán A, Pintado B, Sánchez-García I.

Título: “SLUG (SNAI2) overexpression in embryonic development”.

Revista: Cytogenet Genome Res. 2006; 114(1):24-9. PMID: 16717446

Autores (por orden de firma): García JL, **Robledo C**, Lumbreras E, Flores T, Ramos L, Hernández JM.

Título: “Analysis of chromosomal imbalances in an old woman with a giant cell tumor”.

Revista: Virchows Archiv 2006 Jan; 448(1): 95-9. PMID: 16220295

Autores (por orden de firma): Castellanos MV, Hernández JM, Ramos L, González MB, Gutiérrez NC, Leone PE, Lumbreras E, **Robledo C**, García JL

Título: “Chromosomal abnormalities are related to location and grade of osteoarthritis”.

Revista: Osteoarthritis and Cartilage. 2004 Dec; 12(12): 982-5. PMID: 15564065.



MINISTERIO
DE INDUSTRIA, TURISMO
Y COMERCIO



Oficina Española
de Patentes y Marcas

Justificante de presentación electrónica de solicitud de patente

Este documento es un justificante de que se ha recibido una solicitud española de patente por vía electrónica, utilizando la conexión segura de la O.E.P.M. Asimismo, se le ha asignado de forma automática un número de solicitud y una fecha de recepción, conforme al artículo 14.3 del Reglamento para la ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes. La fecha de presentación de la solicitud de acuerdo con el art. 22 de la Ley de Patentes, le será comunicada posteriormente.

Número de solicitud:	P201030872	
Fecha de recepción:	07 junio 2010, 12:40 (CEST)	
Oficina receptora:	OEPM Madrid	
Su referencia:	P-03610	
Solicitante:	Fundación de Investigación del Cáncer de la Universidad de Salamanca (FICUS)	
Número de solicitantes:	1	
País:	ES	
Título:	MÉTODO DE DIAGNÓSTICO IN VITRO DE PACIENTES CON LINFOMA ESPLÉNICO DE LA ZONA MARGINAL	
Documentos enviados:	Descripcion.pdf (20 p.) Reivindicaciones.pdf (3 p.) Resumen-1.pdf (1 p.) Dibujos-1.pdf (7 p.) FEERCPT-1.pdf (1 p.) SEQLPDF.pdf (267 p.) SEQLTXT.txt	package-data.xml es-request.xml application-body.xml es-fee-sheet.xml feesheet.pdf request.pdf
Enviados por:	CN=NOMBRE ILLESCAS TABOADA MANUEL - NIF 05201779F,OU=500690102,OU=FNMT Clase 2 CA,O=FNMT,C=ES	
Fecha y hora de recepción:	07 junio 2010, 12:40 (CEST)	
Codificación del envío:	78:24:DA:6D:A7:F5:CB:AD:F9:1E:28:35:B6:89:31:03:FA:1C:12:EA	

/Madrid, Oficina Receptora/



(1) MODALIDAD:	PATENTE DE INVENCION MODELO DE UTILIDAD	<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
(2) TIPO DE SOLICITUD:	PRIMERA PRESENTACION ADICION A LA PATENTE EUROPEA ADICION A LA PATENTE ESPAÑOLA SOLICITUD DIVISIONAL CAMBIO DE MODALIDAD TRANSFORMACION SOLICITUD PATENTE EUROPEA PCT: ENTRADA FASE NACIONAL	<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
(3) EXP. PRINCIPAL O DE ORIGEN:	MODALIDAD: N.º SOLICITUD: FECHA SOLICITUD:	
(4) LUGAR DE PRESENTACION: LUGAR		OEPM, Presentación Electrónica
(5-1) SOLICITANTE 1:	DENOMINACION SOCIAL: NACIONALIDAD: CÓDIGO PAÍS: DNI/CIF/PASAPORTE: CNAE: PYME: DOMICILIO: LOCALIDAD: PROVINCIA: CÓDIGO POSTAL: PAÍS RESIDENCIA: CÓDIGO PAÍS: TELÉFONO: FAX: CORREO ELECTRÓNICO: PERSONA DE CONTACTO: MODO DE OBTENCION DEL DERECHO: INVENCION LABORAL: CONTRATO: SUCESION:	Fundación de Investigación del Cáncer de la Universidad de Salamanca (FICUS) España ES G37338126 Patio Escuelas 1 Salamanca 37 Salamanca 37002 España ES <input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
(6-1) INVENTOR 1:	APELLIDOS: NOMBRE: NACIONALIDAD: CÓDIGO PAÍS: DNI/PASAPORTE:	Hernández Rivas Jesús María España ES 06541691-P
(6-2) INVENTOR 2:	APELLIDOS: NOMBRE: NACIONALIDAD: CÓDIGO PAÍS: DNI/PASAPORTE:	García Hernández Juan Luis España ES 07852535-J
(6-3) INVENTOR 3:	APELLIDOS: NOMBRE: NACIONALIDAD: CÓDIGO PAÍS: DNI/PASAPORTE:	Robledo Montero Cristina España ES 70871802-Q

(7) TÍTULO DE LA INVENCION:	MÉTODO DE DIAGNÓSTICO IN VITRO DE PACIENTES CON LINFOMA ESPLÉNICO DE LA ZONA MARGINAL
(8) PETICIÓN DE INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA:	SI NO <input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>
(9) SOLICITA LA INCLUSIÓN EN EL PROCEDIMIENTO ACELERADO DE CONCESIÓN	SI NO <input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>
(10) EFECTUADO DEPÓSITO DE MATERÍA BIOLÓGICA:	SI NO <input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>
(11) DEPÓSITO: REFERENCIA DE IDENTIFICACIÓN: INSTITUCIÓN DE DEPÓSITO: NÚMERO DE DEPÓSITO: ACCESIBILIDAD RESTRINGIDA A UN EXPERTO (ART. 45.1. B):	
(12) DECLARACIONES RELATIVAS A LA LISTA DE SECUENCIAS: LA LISTA DE SECUENCIAS NO VA MÁS ALLÁ DEL CONTENIDO DE LA SOLICITUD LA LISTA DE SECUENCIAS EN FORMATO PDF Y ASCII SON IDENTICOS	<input checked="" type="checkbox"/>
(13) EXPOSICIONES OFICIALES:	LUGAR: FECHA:
(14) DECLARACIONES DE PRIORIDAD:	PAÍS DE ORIGEN: CÓDIGO PAÍS: NÚMERO: FECHA:
(15) AGENTE/REPRESENTANTE:	APELLIDOS: Illescas Taboada NOMBRE: Manuel NACIONALIDAD: España CÓDIGO PAÍS: ES DNI/CIF/PASAPORTE: 05201779-F DOMICILIO: Calle Recoletos nº 13 -5º Izq. LOCALIDAD: Madrid PROVINCIA: 28 Madrid CÓDIGO POSTAL: 28046 PAÍS RESIDENCIA: España CÓDIGO PAÍS: ES TELÉFONO: 34 91 701 16 05 FAX: 34 91 521 65 14 CORREO ELECTRÓNICO: illescas@gonzalezbueno.com NÚMERO DE PODER:
(16) RELACIÓN DE DOCUMENTOS QUE SE ACOMPAÑAN:	DESCRIPCIÓN: <input checked="" type="checkbox"/> N.º de páginas: 20 REIVINDICACIONES: <input checked="" type="checkbox"/> N.º de reivindicaciones: 16 DIBUJOS: <input checked="" type="checkbox"/> N.º de dibujos: 5 RESUMEN: <input checked="" type="checkbox"/> N.º de páginas: 1 FIGURA(S) A PUBLICAR CON EL RESUMEN: <input type="checkbox"/> N.º de figura(s): ARCHIVO DE PRECONVERSION: <input checked="" type="checkbox"/> DOCUMENTO DE REPRESENTACIÓN: <input type="checkbox"/> N.º de páginas: JUSTIFICANTE DE PAGO (1): <input checked="" type="checkbox"/> N.º de páginas: 1 LISTA DE SECUENCIAS PDF: <input checked="" type="checkbox"/> N.º de páginas: 267 ARCHIVO PARA LA BUSQUEDA DE LS: <input checked="" type="checkbox"/>

OTROS (Aparecerán detallados):	
<p>(17) EL SOLICITANTE SE ACOGE AL APLAZAMIENTO DE PAGO DE TASA PREVISTO EN EL ART. 162 DE LA LEY 11/1986 DE PATENTES, DECLARA: BAJO JURAMIENTO O PROMESA SER CIERTOS TODOS LOS DATOS QUE FIGURAN EN LA DOCUMENTACIÓN ADJUNTA:</p> <p style="text-align: right;">DOC COPIA DNI: [] N.º de páginas:</p> <p style="text-align: right;">DOC COPIA DECLARACIÓN DE CARENCIA DE MEDIOS: [] N.º de páginas:</p> <p style="text-align: right;">DOC COPIA CERTIFICACIÓN DE HABERES: [] N.º de páginas:</p> <p style="text-align: right;">DOC COPIA ÚLTIMA DECLARACIÓN DE LA RENTA: [] N.º de páginas:</p> <p style="text-align: right;">DOC COPIA LIBRO DE FAMILIA: [] N.º de páginas:</p> <p style="text-align: right;">DOC COPIA OTROS: [] N.º de páginas:</p>	<p>[]</p>
<p>(18) NOTAS:</p> <p style="text-align: right;">1) Fichero de Preconversión :</p>	<p>Fichero de seguridad por si algunos de los archivos pdf que forman parte de la descripción se corrompieran durante la presentación en línea</p>
<p>(19) FIRMA DIGITAL:</p> <p style="text-align: right;">FIRMA DEL SOLICITANTE O REPRESENTANTE:</p> <p style="text-align: right;">LUGAR DE FIRMA:</p> <p style="text-align: right;">FECHA DE FIRMA:</p>	<p>NOMBRE ILLESCAS TABOADA MANUEL - NIF 05201779F Madrid 07 Junio 2010</p>

Array Comparative Genomic Hybridization Identifies Genetic Regions Associated With Outcome in Aggressive Diffuse Large B-Cell Lymphomas

Cristina Robledo, PhD¹; Juan L. García, PhD^{2,3}; Dolores Caballero, MD, PhD³; Eulogio Conde, MD, PhD⁴; Reyes Arranz, MD, PhD⁵; Teresa Flores, MD, PhD³; Carlos Grande, MD, PhD⁶; José Rodríguez, MD, PhD⁷; Eva García, PhD⁸; Ana I. Sáez, MD, PhD⁹; Marcos González, MD, PhD³; Norma C. Gutiérrez, MD, PhD³; Miguel A. Piris, MD, PhD¹⁰; and Jesús M. Hernández, MD, PhD^{1,3}, on behalf of Spanish Lymphoma/Autologous Bone Marrow Transplant Study Group (GEL-TAMO)

BACKGROUND: Diffuse large B-cell lymphomas (DLBCLs) are the most common type of non-Hodgkin lymphomas. With chemotherapy and progenitor stem cell transplantation, about 60% of patients with DLBCL are long-term survivors. The International Prognostic Index identifies patients with different outcomes. However, biologic characteristics also may help to discriminate different treatments groups. **METHODS:** DNA copy number changes identified by array comparative genomic hybridization (array-CGH) were studied in 40 patients who had DLBCL with a poor prognosis and who were treated uniformly with dose-escalated cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone (CHOP) and intensification before high-dose chemotherapy with autologous stem cell transplantation. **RESULTS:** In total, 722 copy number changes were observed (median, 5 copy number changes per patient; range, 0-75 copy number changes per patient), with a predominance of gains. Gains on 2p16 were present only in patients who failed to achieve a complete response after escalated CHOP therapy ($P < .05$). In univariate analysis, gains on 2p16 and losses on 17p13 (the tumor protein p53 gene *TP53* gene) were associated with a poor response to the therapy. Furthermore, age >60 years and losses on 10q23.31 (the phosphatase and tensin homolog gene *PTEN*) or on 17p13 were associated with short survival. In multivariate analysis, only advanced age and losses on 10q23.31 retained an adverse prognostic impact. **CONCLUSIONS:** Array-CGH identified multiple regions with common copy number changes, some of which were associated with outcome in patients with DLBCL. **Cancer** 2009;115:3728-37. © 2009 American Cancer Society.

Corresponding author: and Jesús M. Hernández, MD, PhD, Servicio de Hematología y Departamento de Medicina, Hospital Universitario de Salamanca, Paseo San Vicente 58, 37007 Salamanca, Spain; Fax: (011) 34-92-329-4624; jmhr@usal.es

¹Institute of Molecular and Cellular Biology of Cancer, Cancer Research Center, University of Salamanca, Salamanca, Spain; ²Institute for Health Science Studies of Castilla and León, Castilla and León, Spain; ³University Hospital of Salamanca, Salamanca, Spain; ⁴Marqués de Valdecilla Hospital and University of Cantabria, Santander, Spain; ⁵La Princesa Hospital, Madrid, Spain; ⁶Doce de Octubre Hospital, Madrid, Spain; ⁷Leganés Hospital, Madrid, Spain; ⁸Genomics Unit, Cancer Research Center, University of Salamanca, Salamanca, Spain; ⁹Tumor Bank Network of Andalusia, Granada, Spain; ¹⁰National Cancer Research Center (CNIO), Madrid, Spain

The first two authors contributed equally to this article.

We thank Professor Jesús F. San Miguel for his critical review of the article; Eva Lumbreras, Teresa Prieto, Irene Rodríguez, Sara González, Yanira de Paz, and Teresa Hernández from Cancer Research Center, Salamanca; and Irene Cuenca and Laura Cereceda from the Tumor Bank, Spanish National Cancer Research Center for their technical assistance.

Received: September 4, 2008; **Revised:** December 4, 2008; **Accepted:** January 14, 2009

Published online: June 10, 2009 © 2009 American Cancer Society

DOI: 10.1002/cncr.24430, www.interscience.wiley.com

KEY WORDS: array comparative genomic hybridization, diffuse large B-cell lymphoma, fluorescence in situ hybridization, dose-escalated cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone, outcome.

Diffuse large B-cell lymphomas (DLBCLs) are the most common group of malignant lymphomas, accounting for 30% of adult non-Hodgkin lymphomas (NHLs) but representing a heterogeneous group of tumors on morphologic, phenotypic, molecular, and clinical grounds.^{1,2} Furthermore, this group of lymphomas is heterogeneous in terms of response to therapy: Half of all patients achieve a complete response with standard anthracycline-based chemotherapy. In DLBCL, the International Prognostic Index (IPI) is the most important tool for predicting response to treatment and for classifying patients into subgroups with different prognoses.³ However, even within these IPI risk groups, variability in outcome has been observed.⁴

Genetically, DLBCLs are characterized by clonal chromosomal rearrangements, often involving the immunoglobulin (Ig) gene loci and somatic hypermutation at the Ig heavy-chain locus, all indicative of a germinal center-derived mature B-cell origin.⁵ Up to 50% of DLBCLs harbor translocations involving the Ig genes.^{6,7} Most common translocations in DLBCL bring genes, including B-cell lymphoma 6 (*BCL6*) (35%-50%), myelocytomatosis oncogene viral oncogene homolog (*C-MYC*) (15%), and *BCL2* (13%) under the inappropriate control of an Ig-regulatory element.

The application of genome scanning technologies, such as comparative genomic hybridization (CGH) and array-CGH, has been useful not only for genome scanning of tumor cells but also for the identification of novel oncogenes and suppressor genes.⁸⁻¹¹ However, the role of genomic gains or losses in the outcome of patients with DLBCL remains unclear. Thus, the breakpoints at 1q21 and deletions of 6q may be associated with poor outcome, whereas chromosomal-CGH suggests an association between 17p loss and short survival.^{5,12} In addition, array-CGH studies have focused on target gene identification, indicating that the loss of chromosomes 2 and 16 may be prognostic indicators of poor survival. However, those studies were hampered by considerable bias, because they were not performed in uniformly treated patients.¹³

To identify regions of DNA copy number changes associated with response to therapy and outcome, we analyzed a series of 40 patients with newly diagnosed DLBCL who were treated with dose-escalated cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone (CHOP) and intensification before high-dose therapy/autologous stem cell transplantation by means of a comprehensive array-CGH analysis. All patients were included in a prospective trial from the Spanish Lymphoma/Autologous Bone Marrow Transplant Study Group (GEL-TAMO).

MATERIALS AND METHODS

Patients

Forty patients with gallium-avid DLBCL according to the World Health Organization classification were studied. All patients received Mega-CHOP for 3 courses and were evaluated for response by using computed tomography (CT) scans and gallium 67 (Ga^{67}) scans. The 40 patients were from a series of 86 patients who were included in a clinical trial, and the only selection criterion was the availability of material for array-CGH analysis. There were no differences in terms of presentation features, response to treatment, or outcomes between patients who were included in the current study and the entire patient population. A complete response (CR) was defined as the disappearance of all clinical, analytic, and radiologic evidence of disease for at least 3 months after transplantation. An uncertain CR was considered for patients who met CR criteria but had residual CT abnormalities. A partial response (PR) was defined as a decrease $>50\%$ in the sum of the products of the 2 greatest dimensions of all measurable lesions without any increasing or new lesions. Treatment failure (TF) was defined as a decrease $<50\%$ in the sum of the products of the 2 greatest dimensions of all measurable lesions, or any increase $>25\%$ in the sum of the greatest dimension of any measurable lesions, or the emergence of a new lesion, regardless of the response in

Table 1. Clinical Characteristics of the Patients With High-Risk, Diffuse Large B-Cell Lymphoma at Diagnosis

Variable	No. of Patients (%)
Median age [range], y	53 [24-68]
Sex (men/women)	21/19
Ann Arbor stage III-IV	36 (90)
B symptoms	25 (63)
≥2 Extranodal sites	14 (35)
BM involvement	10 (25)
Bulky mass	15 (38)
ECOG PS>1	21 (53)
High LDH	33 (83)
High β2M	19 (48)

BM indicates bone marrow; ECOG PS, Eastern Cooperative Oncology Group performance status; LDH, lactate dehydrogenase; β2M, beta-2-microglobulin.

primary involved areas. In addition, when a gallium scan was included in the evaluation of response, a CR was defined as a negative Ga⁶⁷ scan with a CR or PR on CT scans; whereas a positive Ga⁶⁷ scan after the third cycle of therapy included 2 different cohorts: patients in PR on CT scans and patients with TF, including patients who had less than a PR on CT scans.¹⁴

All patients who were included in this protocol had aggressive lymphomas with an age-adjusted IPI score >1 or an IPI score of 1 plus a high β2 microglobulin level. Patients who had transformed lymphomas were excluded. A central histologic review by expert hemopathologists (T.F., A.I.S., M.A.P.) was performed in all patients. The study protocol was approved by local ethical committees, and written informed consent was obtained. The main characteristics of these patients are listed in Table 1. The median patient age was 53 years (range, 24-68 years). Most patients had disease in an advanced clinical stage with B-symptoms and high lactate dehydrogenase levels. The median follow-up was 34 months. Fifteen patients died.

DNA Isolation

Genomic DNA was extracted from fresh-frozen samples (19 patients) and from formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) samples (21 patients). The tissue sections (4 μm) were deparaffinized 3 times in 1 mL xylene and 3 times in 1 mL 100% ethanol for 10 minutes each. After air drying, samples were suspended in 200 μL of DNA extraction

buffer composed of 180 μL of ATL buffer and 20 μL of proteinase K (both from the QIAamp DNA Mini kit; Qiagen, Valencia, Calif) and were incubated at 55°C overnight. After incubation, the DNA was extracted according to the manufacturer's recommendations. The DNA from fresh-frozen samples was extracted using the standard phenol-chloroform method.¹⁵ Normal DNA was prepared from the human placenta of healthy donors. All DNA was quantified using the NanoDrop spectrophotometer (ND-1000; NanoDrop Technologies, Wilmington, Del). DNA was assessed for quality by using the 260:280 ratio, and its integrity was assessed by using agarose gel ethidium bromide visualization.¹⁶

Array Comparative Genomic Hybridization

A genome-wide analysis of DNA copy number changes in patient samples was performed using array-CGH. Slides that contained 3528 bacterial artificial chromosomes (BACs) spanning the genome were produced at the Cancer Research Center (Salamanca, Spain). The particular BAC and P-1 derived artificial chromosome (PAC) set that we used to AU: Is "Center for Cancer Research" the correct translation here? produce this array was distributed to academic institutions by the Wellcome Trust Sanger Institute (Cambridge, United Kingdom) and contains targets spaced at ≈1 Mb density over a full genome, a set of subtelomeric sequences for each chromosome arm, and a few hundred probes selected for their involvement in oncogenesis. The clone content is available online in the "Cytoview" windows of the Sanger Institute mapping database site (available at: <http://www.ensembl.org/> accessed August 2008). According to this database, clones were ordered along the chromosomes. These clones were isolated from their bacterial cultures and the DNA was extracted using the standard protocol of the Wellcome Trust Sanger Institute. Ten nanograms of DNA (BAC/PAC) were used as a template for 3 degenerated oligonucleotide primed-polymerase chain reaction (DOP-PCR) analyses. These products were ethanol precipitated and dissolved in an aqueous dimethyl sulfoxide buffer as a spotting solution. A minimum of 3 replicates per clone were printed by Microgrid II (Biorobotics Ltd., Cambridge, United Kingdom) on each slide (UltraGAPS coated slides; Corning Life Sciences, Big Flats, NY). Briefly, to test for labeling reactions, 2 μg of nonamplified

genomic DNA, test (tumor) DNA, and 2 μg of reference material (placental DNA) were digested separately with *DpnII* restriction enzyme (New England Biolabs, Beverly, Mass). For microarray hybridization, the digested DNAs were labeled separately using random primers (Bioprimer labeling kit; Invitrogen, Carlsbad, Calif) and indocarbocyanine (Cy3)-deoxycytidine 5'-triphosphate (dCTP) and indodicarbocyanine (Cy5)-dCTP fluorescent dyes for paired hybridization samples (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). The labeled nucleotide incorporation was quantified using the NanoDrop spectrophotometer (ND-1000). Labeled test and reference DNA samples were mixed equitably, coprecipitated in the presence of Cot-1 human DNA (Roche, Indianapolis, Ind) with ethanol, washed, and resuspended in hybridization solution (50% formamide; 10% dextran sulfate; 2 \times standard saline citrate; 10 mM Tris, pH 7.6; 2.7% sodium dodecyl sulfate; and 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ yeast transfer RNA). DNA mixtures were cohybridized to the arrays in the GENETAC (Genomic Solutions, Ann Arbor, Mich) for 48 hours at 42°C according to the manufacturer's recommended protocol. Images and signal intensities were acquired using the GenePix4000B (Axon Instruments, Burlingame, Calif) dual laser scanner in combination with the GenePixPro4.0 (Axon Instruments) imaging software.¹³

Data Analysis

The Cy5/Cy3 intensity ratios of every spot were converted into \log_2 ratios. The \log_2 ratio of each clone was normalized to the median \log_2 ratio of the 10 control hybridizations; then, the median of triplicate spots was calculated. Data from 2-color hybridizations for both sets of DNA was normalized using the DNMAID module of GEPAS software.¹⁷⁻¹⁹ Regions of copy number gains and losses for the BAC array-CGH data were identified by creating sample specific thresholds.²⁰ The clones with \log_2 ratios above or below a control sample's threshold value were considered gains or losses, respectively. At least 2 contiguous BAC clones with a \log_2 ratio ≤ -0.4 was defined as a loss region, and a \log_2 ratio $\geq +0.4$ was defined as a gain region. Furthermore, spots with weak Cy3 or Cy5 intensity (below $R^2 < 0.2$) were excluded from analysis. In addition, clones that had a standard deviation >0.3 in triplicate spots also were excluded. In total, approximately

10% of clones were excluded. All datasets were reviewed carefully for frequently affected chromosomal sites of physiologic copy number polymorphisms. Therefore, every clone on the array was compared with the 'Database of Genomic Variants' (available at: www.project.tcag.ca/cariation accessed August 2008) and with the database of chromosomal imbalances and phenotype in humans using Ensembl Resources (DECIPHER: available at: <http://www.sanger.ac.uk/PostGenomics/decipher/> accessed August 2008).²⁰⁻²²

Fluorescence in Situ Hybridization Analysis

To confirm the gains and losses assessed by array-CGH, fluorescence in situ hybridization (FISH) analysis was performed using the BAC clones RP11-165M8 and RP11-380G5 (covering the phosphatase and tensin homolog gene [*PTEN*] mapped to 10q23.31), RP11-186B7 and RP11-199F11 (covering the tumor protein p53 gene [*TP53*] mapped to 17p13.1), RP11-440P5 (covering the *BCL11A* gene), and RP11-373L24 (covering the reticuloendotheliosis viral oncogene homolog gene [*c-REL*] mapped to 2p16.1), and RP11-98D18 and RP11-172I6 mapped to 1q21, as described previously.²³ These clones were selected from the array-CGH BAC clones library (Wellcome Trust Sanger Institute). DNA from the BAC clones was isolated and labeled directly with either Spectrum Green-2'-deoxyuridine 5'-triphosphate (dUTP) or Spectrum Orange-dUTP (Vysis, Downers Grove, Ill) by nick translation and hybridized according to the manufacturer's protocols. All BAC clones were hybridized first to normal human metaphase chromosomes to verify their location. The changes were validated by FFPE tumor sections and in fixed cells after 24 hours culture. A minimum of 200 interphase nuclei were scored using a E1000 microscope (Nikon, Tokyo, Japan) equipped with the Quips system, (Vysis).

Statistical Analysis

The relation between clinical or biologic data and genomic characteristics was analyzed using an independent sample *t* test. Overall survival was calculated as the time from the start of treatment to the date of either death or last follow-up. Survival and response duration were analyzed using the Kaplan-Meier method²⁴ and were

compared using the log-rank test.²⁵ Multivariate analysis with the variables that proved to be significant in the univariate analysis was performed according to the Cox proportional hazards regression model.²⁶ All *P* values reported were 2-sided, and statistical significance was defined as *P* values < .05. Statistical evaluation was carried out using SPSS 15.0 statistical software.

RESULTS

Array Comparative Genomic Hybridization Analysis of 40 Diffuse Large B-Cell Lymphoma Specimens

In 38 of 40 patients, genomic changes were observed (95%). In total, 722 altered regions were present (median, 5 altered regions per patient; range, from 0 to 75 altered regions per patient). The most frequent changes were chromosomal gains, which were detected on 11q23.3 (20 of 40 patients; 50%), 3p21.1 (19 of 40 patients; 48%), 6p21.1 (18 of 40 patients; 45%), 11q12-q13.1 (18 of 40 patients; 45%), 12q13-q14.1 (17 of 40 patients; 43%), and 1q21-q22 (16 of 40 patients; 40%); whereas genomic losses were located on 5q21.1 (13 of 40 patients; 33%), 8q23.1 (10 of 40 patients; 25%), 11q14.3 (10 of 40 patients; 25%), and 3q13.31 through q13.32 (9 of 40 patients; 23%) (Fig. 1). It is noteworthy that only 2 patients had gains in chromosome 18q, and losses in 9p21 were present in only 1 patient. In chromosome 10q, 2 independent segments of common deletion were delineated at 10q23.31 (4 of 40 patients; 10%) and at 10q25.1 through q26.3 (6 of 40 patients; 15%). In 10q23.31, 4 patients (10%) exhibited deletion encompassing the *PTEN* locus. A critical segment of loss was delineated in 7 patients (18%) on chromosome 17p, at 17p13.1, spanning the *TP53* gene locus.

Correlation Between Genomic Imbalances and Clinical and Biologic Characteristics

Table 2 illustrates the correlation between gains and losses assessed by array-CGH and the most relevant clinical and biologic characteristics of this group of aggressive DLBCLs. It should be noted that patients who had loss on 17p13.1 had high levels of lactate dehydrogenase

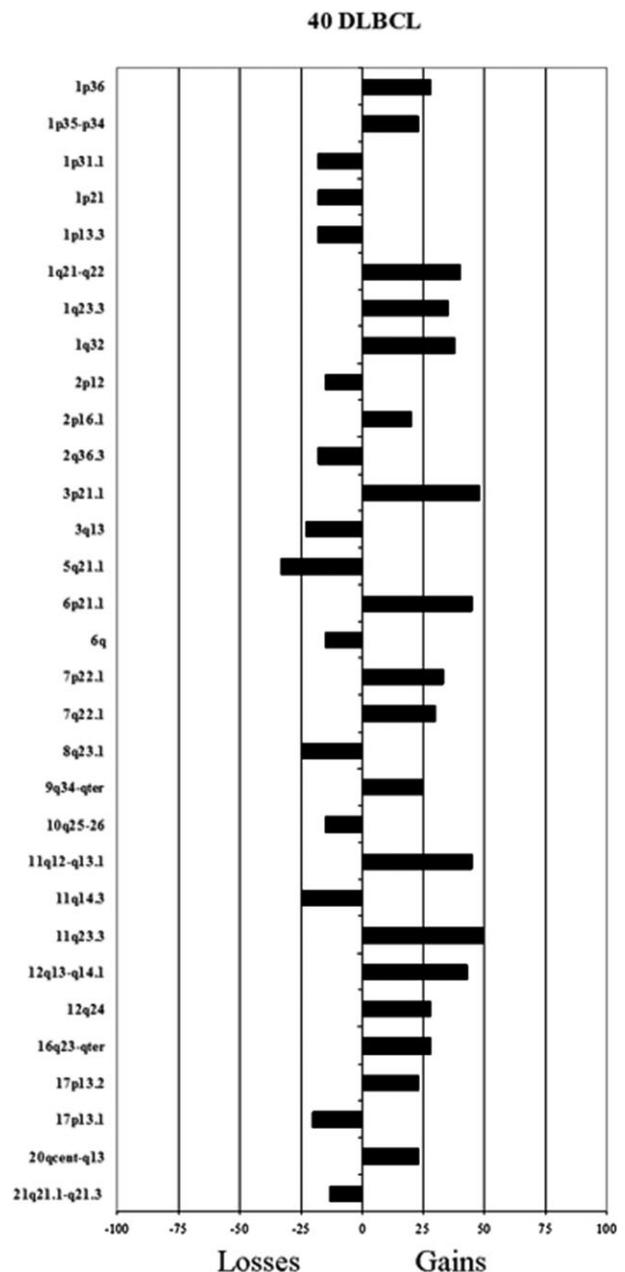


FIGURE 1. Common regions of genomic gains or losses are illustrated in 40 patients with diffuse large B-cell lymphomas (DLBCL). The tree shows the genomic regions that exhibited gains (right) or losses (left). For each region, a corresponding cytogenetic location and the respective frequency of change within the cohort are given.

(*P* < .05), whereas patients who had advanced Ann Arbor stage (III-IV) disease had gains on 1q, 3p, 6p, 7p, 16, 20q, or 22 as well as losses on 5q21.1 and 10q23.31 (*P* < .05). In addition, the presence of bulky mass was correlated with gains on 11q or 12q (*P* < .05).

Table 2. Correlations Between Genomic Imbalances Assessed by Array Comparative Genomic Hybridization and the More Salient Clinical and Biologic Characteristics in Patients With High-Risk, Diffuse Large B-Cell Lymphoma*

Ann-Arbor Stage III-IV		Age < 60 y	B Symptoms		Bulky Mass	↑ LDH
Gains	Losses	Gains	Gains	Losses	Gains	Losses
1p36	5q21.1	3p21.1	12q13	2p12	11q23.3	17p13.3
1q21-22	10q23.3	12q14.1		2q36.3	12q14.1	
1q32		12q24		11q14.3		
3p21.1						
6p21.1						
7p22.1						
16p11.2						
16q23						
20q						
22						

LDH indicates lactate dehydrogenase.

* $P < .05$ for all correlations.

DNA Copy Number Changes Are Associated With Response to Treatment With Mega-Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine, and Prednisone Chemotherapy

After 3 Mega-CHOP courses, 17 of 40 patients (42.5%) were in CR according to Gallium scans, 32.5% of patients were in PR, and the remaining 10 patients had not responded. Figure 2 illustrates the most frequent genomic changes in association with responses to chemotherapy.

It is noteworthy that gains in 2p16 were present only in patients who failed to achieve a CR after Mega-CHOP. Furthermore, gains in 2p16 were associated with disease progression or recurrence after chemotherapy ($P = .008$). A common gained region for the 8 patients who had gains on 2p16 was confined to a 634-kb region between BAC clones bA440P5 and bA373L24. This region contains *REL* and *BCL11A* as candidate genes. In addition, none of the patients who had a loss in 17p13.1 (containing the *TP53* gene) had a CR after Mega-CHOP ($P = .02$). In the univariate analysis, only gains on 2p16 and losses on 17p13.1 were related to failure on Mega-CHOP therapy. Both variables (gains on 2p16 and losses on 17p13.1) were selected in the regression model for an analysis of response to therapy.

Correlation Between Genomic Changes and Survival in Diffuse Large B-Cell Lymphoma

All clinical, biologic, and genomic variables were analyzed in relation to survival. Regarding clinical variables, only

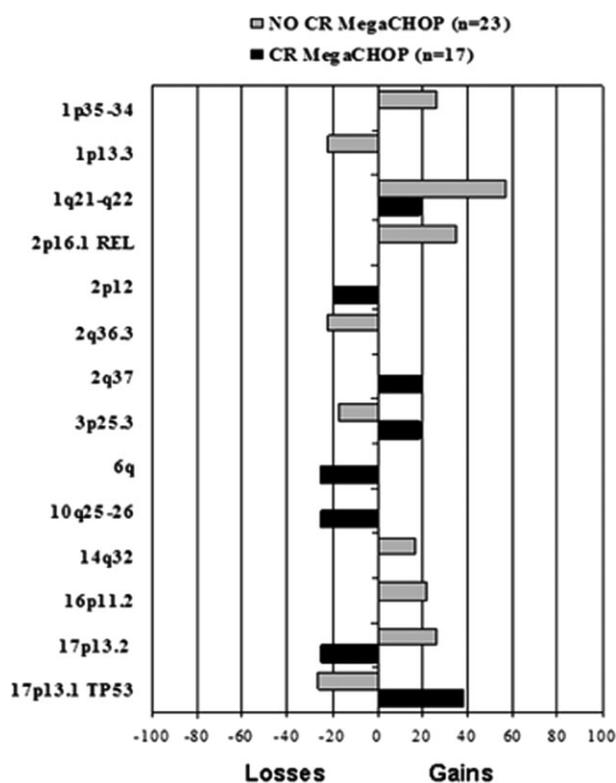


FIGURE 2. This chart summarizes the regions involved in patients with diffuse large B-cell lymphoma after they received a dose-escalated regimen of combined cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone (CHOP) and intensification before high-dose therapy/autologous stem cell transplantation. The frequency of gains (right) and losses (left) in patients who achieved complete remission (CR) after Mega-CHOP are indicated by black bars, and non-responding patients (NO CR) are indicated by gray bars.

age >60 years was correlated with short survival, whereas an adjusted IPI score had no impact on survival. It should be noted that patients who had a loss in 10q23.31, which contains the *PTEN* gene ($P = .03$), or a loss in 17p13.1 ($P = .02$) also had short survival (median survival: 10 months for patients who had loss of 10q23.31, not reached for patients who had normal 10q23.31, 11 months for patients who had loss of 17p13.1, and not reached for patients who had normal 17p13.1). No other biologic or genomic data were correlated with survival (Fig. 3). All variables that were related to survival in the univariate analysis were included in the multivariate analysis: The Cox regression model indicated that only age ($P = .01$) and loss of 10q23.31 ($P = .03$) were correlated with short survival.

Fluorescence in Situ Hybridization Validation of Gains and Losses Identified by Array Comparative Genomic Hybridization

To confirm the genetic imbalances observed by array-CGH, FISH experiments were carried out in 20 patients. In all patients, FISH analysis confirmed the array-CGH results. The selection of the patients was based on both the availability of the sample (FFPE tumor sections or fixed cells after 24 hours in culture) and the presence of a genetic imbalance in 1 of the following regions: 1q21, 2p16, 10q23, or 17p13.1. Thus, to confirm abnormalities in 17p13, 8 patients were analyzed. Four of those patients had loss of 17p13, 2 patients had gain of this region, and the remaining 2 patients did not have imbalances on 17p13. In all patients, FISH confirmed the array-CGH results. In 4 patients, the 1q21 region was analyzed by FISH. Two of those patients had a gain of this region by

array-CGH analysis, and FISH also verified the presence of a gain in this region; whereas the remaining 2 patients had normal array-CGH and FISH results. FISH analysis of the 2p16 region was performed in 4 patients: Three of those patients had a gain in this region according to array-CGH analysis, and FISH confirmed the presence of 3

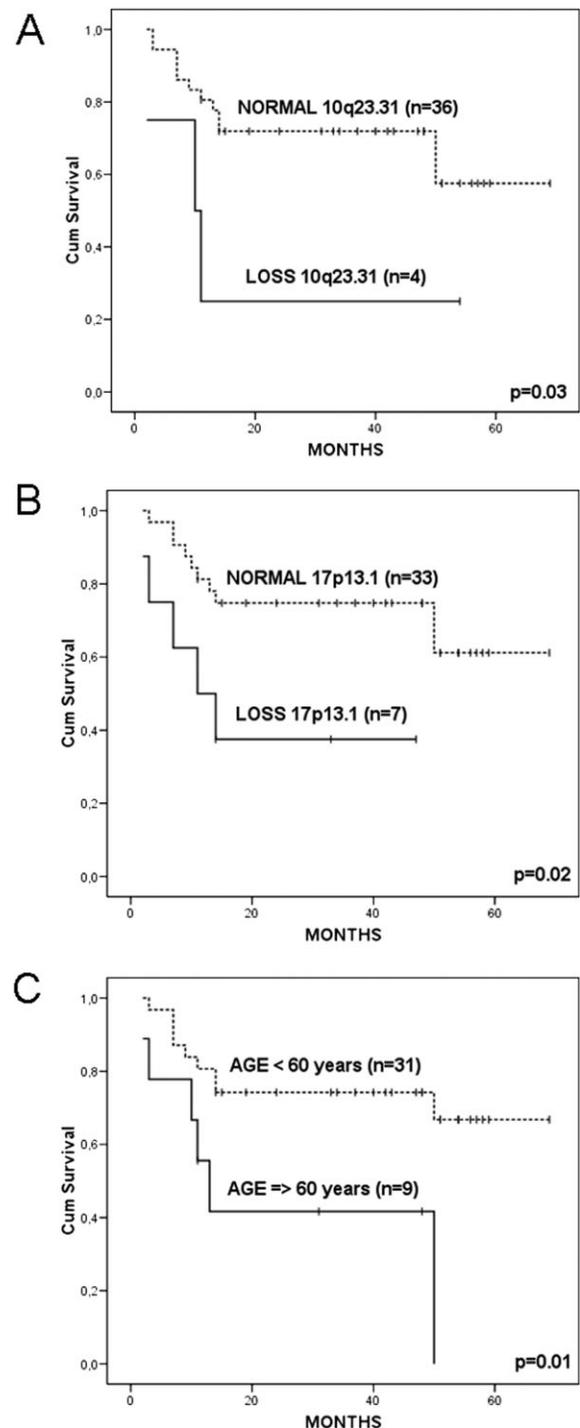


FIGURE 3. These are Kaplan-Meier plots of overall survival for in patients with diffuse large B-cell lymphoma according to chromosomal imbalances. (A) Losses of chromosome 10q23 ($n = 4$) containing the phosphatase and tensin homolog gene *PTEN* were associated with inferior survival (median cumulative [Cum] survival, 10 months vs not reached for normal 10q23; $n = 36$; $P = .03$). (B) Losses of 17p13 ($n = 7$; containing the *TP53* gene) were associated with inferior survival (median survival, 11 months vs not reached for normal 17p13; $n = 33$; $P = .02$). (C) Patients aged >60 years ($n = 9$) also had a shorter survival (median survival, 13 months vs not reached for those aged ≤60 years; $n = 31$; $P = .01$).

hybridization signals in these patients. The remaining patient did not have 2p16 abnormalities according to array-CGH or FISH. Finally, the 10q23 region was analyzed in 4 patients: Two of those patients had a loss of the region according to array-CGH analysis and also presented 1 hybridization signal according to FISH. By contrast, 2 patients who had normal 10q23 region results in array-CGH analysis also had normal FISH results.

DISCUSSION

Chemotherapy cures approximately 50% of patients who have aggressive B-cell NHL. However, patients who have high IPI scores have a dismal prognosis. Therefore, high-dose chemotherapy with autologous stem cell transplantation (ASCT) has been used widely in these patients.²⁷ Recently, the GEL-TAMO group reported results from 86 patients who had DLBCL with a poor prognosis who were treated with escalated CHOP and tailored intensification with combined ifosfamide and etoposide before combined carmustine, etoposide, cytarabine, and melphalan/ASCT. This strategy resulted in progression-free and overall survival rates at 5 years of 56% and 64%, respectively.¹⁴ It is noteworthy that, in that GEL-TAMO trial, which included only patients with a poor prognosis, the impact of the IPI score was not detected. Therefore, new predictors like biologic markers are needed to identify patients who belong in this poor prognostic group. In the current study, we report the results from an array-CGH analysis of the genome from a series of 40 patients who were included in that prospective trial. Our results indicate a correlation between genomic imbalances and patient outcomes.

We previously confirmed that the regions affected more frequently in patients with DLBCL were 7p22, 11q23, and 3p25, all of which had gains, and regions 1p31, 6q, and 17p13, which had losses.^{13,28} By contrast, in the current study, we observed more patients with losses in 5q21, 8q23, and 11q14 as well fewer patients who had gains on chromosome 18q and losses on 9p21 than usually are reported.^{13,28-30} These differences may be related to the high-risk characteristics of the patients in our series. To date, array-CGH studies on NHL have focused mainly on target gene identification rather than clinical correlations.^{13,28} Furthermore, those series have not included patients who were treated prospectively and homogeneously.

We observed a different genetic profile in those patients who have achieved a CR versus those who only reached a PR or who failed to respond to Mega-CHOP therapy. With regard to these findings, gains in 2p16 were most frequent in patients who failed to achieve a CR. It is noteworthy that a gain in chromosome 2p has been identified as a recurrent alteration in 20% of patients DLBCL^{12,31-37} and is the most frequent CGH alteration in classic Hodgkin lymphoma (identified in 50% of patients).^{38,39} The common recurrent region expands 4.2 Mb in 2p15-16.^{38,39} By using array-CGH, we were able to restrict the minimal common region to 700 Kb in length. Two oncogenes involved in lymphomagenesis, *REL* and *BCL11A*, are located in this region.^{12,40} In fact, the overexpression of both genes was observed in all patients who had DLBCL with 2p amplification by means of real-time quantitative PCR.¹² In the current study, we were able to identify the minimally targeted genomic regions of 2p16.1 amplification, where *REL* (and not *BCL11A*) was located, as the only candidate oncogene. Similar data recently were reported from array-CGH with the conclusion that the *REL* gene may play a more important role than *BCL11A* in the pathogenesis of DLBCL.⁴¹ Furthermore, it has been reported that high copy numbers of *REL* are correlated with extranodal disease in DLBCL.³¹ In our multivariate analysis, only the presence of gains in 2p16.1 was associated with Mega-CHOP-resistant disease, suggesting that this genetic abnormality may be included as a prognostic factor in DLBCL.

Regarding the correlation between genomic changes and patient outcomes, our univariate analysis indicated that losses of chromosomes 10q23.31 (10%; $P = .03$) containing the *PTEN* gene, 17p13.1 (18%; $P = .02$) covering the *TP53* gene, and advanced age ($P = .01$) were associated with inferior survival. Indeed, in our Cox proportional hazards model, losses in 10q23.23 ($P = .03$) and age ($P = .01$) remained as independent variables that influenced overall survival. Recently, it was reported that 37% of patients with DLBCL had loss of or reduced *PTEN* expression, and this feature was associated with short overall survival in a retrospective series of patients with DLBCL.⁴² In addition, the loss of nuclear *PTEN* was correlated with poor survival in patients with germinal center NHL.⁴³ These data may implicate the *PTEN*/phosphatidylinositol 3'-kinase (*PI3K*)/protein kinase B (*AKT*) pathway in the development and progression of

DLBCL.^{42,44} In addition, losses in region 17p13.1 also have been associated with the lack of a CR to escalated CHOP and a trend toward a short survival. These results are in agreement with previous studies, which associated inactivation of the *TP53* gene with clinical progression, a poor prognosis, drug resistance, and low CR rates in patients with aggressive B-cell lymphoma.⁴⁵

To summarize, the current results demonstrate that the application of high-resolution scanning of the genome has contributed to identifying new regions associated with a poor outcome in a group of patients who have high-risk DLBCL and may help in the stratification of this group of aggressive lymphomas. Accordingly, the status of 2p, 10q, and 17p should be investigated in these patients.

Conflict of Interest Disclosures

Supported in part by grants from Spanish FIS (02/1041); Bank of Burgos Fund for Clinical Investigation, "Proyectos de investigación del SACYL 106/A/06," and by an Investigation Project of the Medical Health Service of "Castilla y León (SACYL 106/A/06)," and by the "Acción Transversal del Cancer" project through an agreement between the Carlos III Health Institute, the Spanish Ministry of "Instituto de Salud Carlos III (ISCIII)," Spanish Ministry of Science and Innovation, and the Cancer Research Foundation of Salamanca University, and Research Network RTIIC (FIS).

References

1. The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma. *Blood*. 1997;89:3909-3918.
2. Harris NL, Jaffe ES, Stein H, et al. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood*. 1994;84:1361-1392.
3. The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project. A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med*. 1993;329:987-994.
4. van Imhoff GW, Boerma EJ, van der HB, et al. Prognostic impact of germinal center-associated proteins and chromosomal breakpoints in poor-risk diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol*. 2006;24:4135-4142.
5. Chaganti RS, Nanjangud G, Schmidt H, Teruya-Feldstein J. Recurring chromosomal abnormalities in non-Hodgkin's lymphoma: biologic and clinical significance. *Semin Hematol*. 2000;37:396-411.
6. Kameoka Y, Tagawa H, Tsuzuki S, et al. Contig array CGH at 3p14.2 points to the FRA3B/FHIT common fragile region as the target gene in diffuse large B-cell lymphoma. *Oncogene*. 2004;23:9148-9154.
7. Skinnider BF, Horsman DE, Dupuis B, Gascoyne RD. Bcl-6 and Bcl-2 protein expression in diffuse large B-cell lymphoma and follicular lymphoma: correlation with 3q27 and 18q21 chromosomal abnormalities. *Hum Pathol*. 1999;30:803-808.
8. Albertson DG, Ylstra B, Seagraves R, et al. Quantitative mapping of amplicon structure by array CGH identifies CYP24 as a candidate oncogene. *Nat Genet*. 2000;25:144-146.
9. Ota A, Tagawa H, Karnan S, et al. Identification and characterization of a novel gene, C13orf25, as a target for 13q31-q32 amplification in malignant lymphoma. *Cancer Res*. 2004;64:3087-3095.
10. Ray ME, Yang ZQ, Albertson D, et al. Genomic and expression analysis of the 8p11-12 amplicon in human breast cancer cell lines. *Cancer Res*. 2004;64:40-47.
11. Tagawa H, Tsuzuki S, Suzuki R, et al. Genome-wide array-based comparative genomic hybridization of diffuse large B-cell lymphoma: comparison between CD5-positive and CD5-negative cases. *Cancer Res*. 2004;64:5948-5955.
12. Bea S, Colomo L, Lopez-Guillermo A, et al. Clinicopathologic significance and prognostic value of chromosomal imbalances in diffuse large B-cell lymphomas. *J Clin Oncol*. 2004;22:3498-3506.
13. Chen W, Houldsworth J, Olshen AB, et al. Array comparative genomic hybridization reveals genomic copy number changes associated with outcome in diffuse large B-cell lymphomas. *Blood*. 2006;107:2477-2485.
14. Arranz R, Conde E, Grande C, et al. Dose-escalated CHOP and tailored intensification with IFE according to early response and followed by BEAM/autologous stem-cell transplantation in poor-risk aggressive B-cell lymphoma: a prospective study from the GEL-TAMO Study Group. *Eur J Haematol*. 2008;80:227-235.
15. Hernandez JM, Garcia JL, Gutierrez NC, et al. Novel genomic imbalances in B-cell splenic marginal zone lymphomas revealed by comparative genomic hybridization and cytogenetics. *Am J Pathol*. 2001;158:1843-1850.
16. Bredel M, Bredel C, Juric D, et al. Amplification of whole tumor genomes and gene-by-gene mapping of genomic aberrations from limited sources of fresh-frozen and paraffin-embedded DNA. *J Mol Diagn*. 2005;7:171-182.
17. Conde L, Montaner D, Burguet-Castell J, et al. ISACGH: a web-based environment for the analysis of Array CGH and gene expression which includes functional profiling. *Nucleic Acids Res*. 2007;35:W81-W85.
18. Herrero J, Al-Shahrour F, Diaz-Uriarte R, et al. GEPAS: a web-based resource for microarray gene expression data analysis. *Nucleic Acids Res*. 2003;31:3461-3467.
19. Montaner D, Tarraga J, Huerta-Cepas J, et al. Next station in microarray data analysis: GEPAS. *Nucleic Acids Res*. 2006;34:W486-W491.
20. Pollack JR, Perou CM, Alizadeh AA, et al. Genome-wide analysis of DNA copy-number changes using cDNA microarrays. *Nat Genet*. 1999;23:41-46.

21. Sebat J, Lakshmi B, Troge J, et al. Large-scale copy number polymorphism in the human genome. *Science*. 2004;305:525-528.
22. Iafrate AJ, Feuk L, Rivera MN, et al. Detection of large-scale variation in the human genome. *Nat Genet*. 2004;36:949-951.
23. Gonzalez MB, Hernandez JM, Garcia JL, et al. The value of fluorescence in situ hybridization for the detection of 11q in multiple myeloma. *Haematologica*. 2004;89:1213-1218.
24. Kaplan E, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc*. 1958;53:457-481.
25. Peto R, Pike MC, Armitage P. Design and analysis of randomized clinical trials requiring prolonged observation of each patient. II. Analysis and Examples. *Br J Cancer*. 1977;35:1-39.
26. Cox DR. Regression models and life-tables. *J R Stat Soc*. 1972;34:187-220.
27. Rodriguez J, Caballero MD, Gutierrez A, et al. Autologous stem-cell transplantation in diffuse large B-cell non-Hodgkin's lymphoma not achieving complete response after induction chemotherapy: the GEL/TAMO experience. *Ann Oncol*. 2004;15:1504-1509.
28. Tagawa H, Suguro M, Tsuzuki S, et al. Comparison of genome profiles for identification of distinct subgroups of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 2005;106:1770-1777.
29. Dierlamm J, Murga Penas EM, Bentink S, et al. Gain of chromosome region 18q21 including the MALT1 gene is associated with the activated B-cell-like gene expression subtype and increased BCL2 gene dosage and protein expression in diffuse large B-cell lymphoma. *Haematologica*. 2008;93:688-696.
30. Bentink S, Wessendorf S, Schwaenen C, et al. Pathway activation patterns in diffuse large B-cell lymphomas. *Leukemia*. 2008;22:1746-1754.
31. Houldsworth J, Mathew S, Rao PH, et al. REL proto-oncogene is frequently amplified in extranodal diffuse large cell lymphoma. *Blood*. 1996;87:25-29.
32. Rao PH, Houldsworth J, Dyomina K, et al. Chromosomal and gene amplification in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 1998;92:234-240.
33. Palanisamy N, Abou-Elella AA, Chaganti SR, et al. Similar patterns of genomic alterations characterize primary mediastinal large-B-cell lymphoma and diffuse large-B-cell lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer*. 2002;33:114-122.
34. Houldsworth J, Olshen AB, Cattoretti G, et al. Relationship between REL amplification, REL function, and clinical and biologic features in diffuse large B-cell lymphomas. *Blood*. 2004;103:1862-1868.
35. Feuerhake F, Kutok JL, Monti S, et al. NFkappaB activity, function, and target-gene signatures in primary mediastinal large B-cell lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma subtypes. *Blood*. 2005;106:1392-1399.
36. Bea S, Zettl A, Wright G, et al. Diffuse large B-cell lymphoma subgroups have distinct genetic profiles that influence tumor biology and improve gene-expression-based survival prediction. *Blood*. 2005;106:3183-3190.
37. Joos S, Otano-Joos MI, Ziegler S, et al. Primary mediastinal (thymic) B-cell lymphoma is characterized by gains of chromosomal material including 9p and amplification of the REL gene. *Blood*. 1996;87:1571-1578.
38. Barth TF, Martin-Subero JI, Joos S, et al. Gains of 2p involving the REL locus correlate with nuclear c-Rel protein accumulation in neoplastic cells of classical Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2003;101:3681-3686.
39. Joos S, Menz CK, Wrobel G, et al. Classical Hodgkin lymphoma is characterized by recurrent copy number gains of the short arm of chromosome 2. *Blood*. 2002;99:1381-1387.
40. Satterwhite E, Sonoki T, Willis TG, et al. The BCL11 gene family: involvement of BCL11A in lymphoid malignancies. *Blood*. 2001;98:3413-3420.
41. Fukuhara N, Tagawa H, Kameoka Y, et al. Characterization of target genes at the 2p15-16 amplicon in diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer Sci*. 2006;97:499-504.
42. Abubaker J, Bavi PP, Al-Harbi S, et al. PIK3CA mutations are mutually exclusive with PTEN loss in diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia*. 2007;21:2368-2370.
43. Fridberg M, Servin A, Anagnostaki L, et al. Protein expression and cellular localization in 2 prognostic subgroups of diffuse large B-cell lymphoma: higher expression of ZAP70 and PKC-beta II in the nongerminal center group and poor survival in patients deficient in nuclear PTEN. *Leuk Lymphoma*. 2007;48:2221-2232.
44. Uddin S, Hussain AR, Siraj AK, et al. Role of phosphatidylinositol 3'-kinase/AKT pathway in diffuse large B-cell lymphoma survival. *Blood*. 2006;108:4178-4186.
45. Ichikawa A, Kinoshita T, Watanabe T, et al. Mutations of the p53 gene as a prognostic factor in aggressive B-cell lymphoma. *N Engl J Med*. 1997;337:529-534.