



Universitat Autònoma de Barcelona

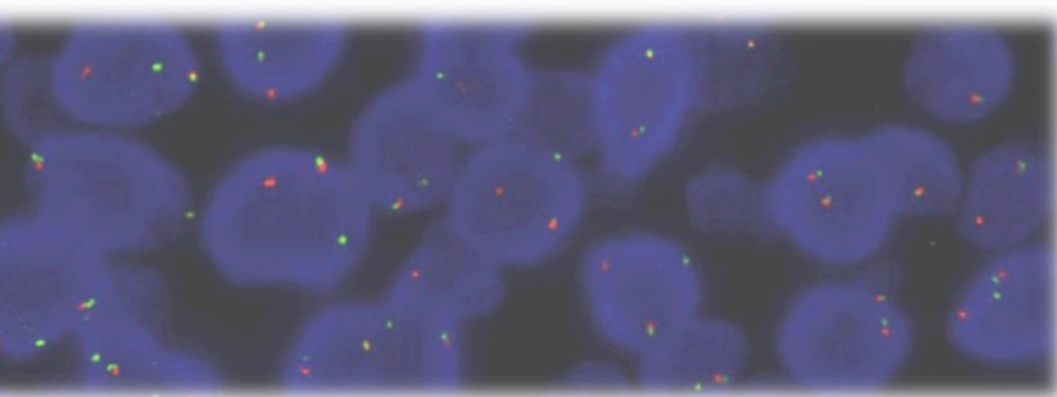
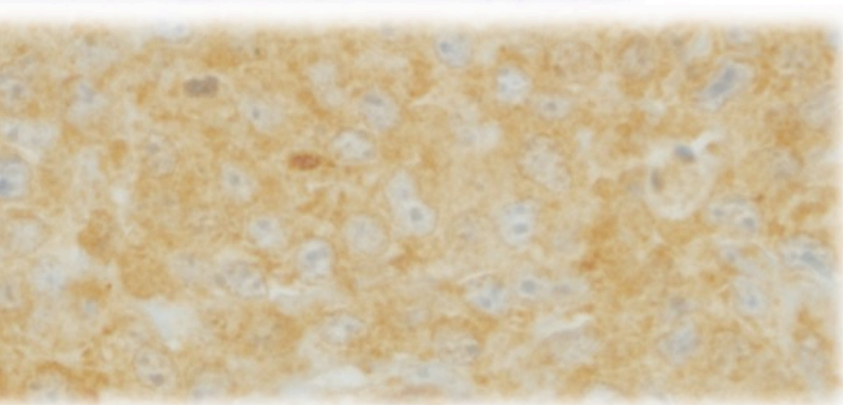
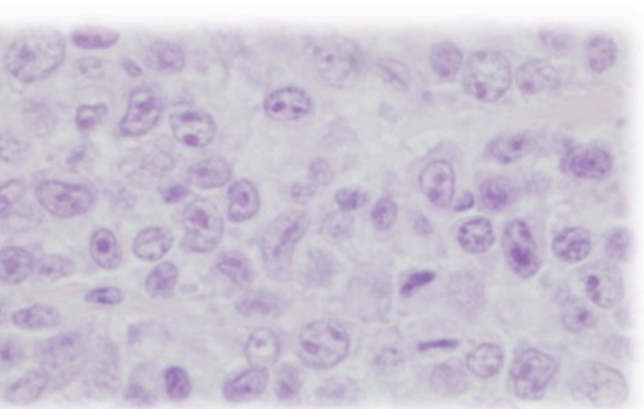
ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

Universitat Autònoma de Barcelona
Facultat de Medicina
Departament de Ciències Morfològiques
2021

**UTILITAT CLÍNICA
DE LA DETERMINACIÓ
IMMUNOHISTOQUÍMICA
DE LMO2 EN LIMFOMES
B AGRESSIUS**



Tesi doctoral
Ivonne Vázquez de las Heras

Director: Dr. Lluís Colomo Saperas
Tutor: Dr. Jose Luis Mate Sanz

FACULTAT DE MEDICINA

PROGRAMA DE DOCTORAT EN CIRURGIA I CIÈNCIES MORFOLÒGIQUES

DEPARTAMENT DE CIÈNCIES MORFOLÒGIQUES

**UTILITAT CLÍNICA DE LA DETERMINACIÓ IMMUNOHISTOQUÍMICA DE
LMO2 EN LIMFOMES B AGRESSIUS**

Memòria de la tesi doctoral presentada per **Ivonne Vázquez de las Heras** per a optar al
títol de **Doctora en Medicina per la Universitat Autònoma de Barcelona**.

Els treballs s'han realitzat al Servei d'Anatomia Patològica de l'Hospital Universitari Parc
de Salut Mar, sota la direcció del Dr. Lluís Colomo Saperas i la tutoria del Dr. Jose Luis
Mate Sanz.

Barcelona, Juny del 2021

*A les meves 'princeses', Íngrid i Aroa
A Lluís
Als meus pares, Pilar i Donald
A la meva família*

Índex

Índex	9
Llista d'abreviacions	13
Llista de figures	17
Llista de taules	19
1. Introducció	21
1.1 Teixits limfoides. Generalitats	23
1.2 Histologia del gangli limfàtic	23
1.3 Caracterització immunohistoquímica dels limfòcits B	25
1.4 Alteracions de la cèl·lula B: limfomagènesi	26
1.5 Limfomes B agressius	26
1.5.1 Definició i classificació de la OMS	26
1.5.2 Limfoma difús de cèl·lules B grans, no especificat (DLBCL,NOS)	28
1.5.3 Limfoma de Burkitt (BL)	40
1.5.4 Limfoma B d'alt grau (HGBL).....	42
1.6 MYC (<i>c-MYC avian myelocytomatosis viral oncogen homolog</i>)	47
1.6.1 Introducció	47
1.6.2 MYC en el desenvolupament de la cèl·lula B	47
1.6.3 MYC com a factor de transcripció i paper en la tumorigènesi i origen de limfoma	48
1.6.4 MYC en els processos limfoproliferatius d'alt grau	50
1.6.5 Alteracions citogenètiques de MYC en els limfomes B d'alt grau.....	53
1.7 LMO2 (<i>Hematopoietic transcription factor LIM domain only protein 2</i>)	56
1.7.1 Introducció	56
1.7.2 Estudis d'expressió i paper pronòstic del gen LMO2.....	58
1.7.3 Expressió immunohistoquímica de LMO2 en les cèl·lules B	58
1.7.4 Paper pronòstic de l'expressió immunohistoquímica de LMO2 en limfomes B agressius	60
2. Justificació de la tesi	63
2.1 Hipòtesi de treball	66
2.2 Objectius del treball	67
3. Treballs relacionats	69
3.1 Primer treball:	71
LMO2-negative expression predicts the presence of MYC translocations in aggressive B-cell lymphomas	71
3.2 Segon treball:	74
Clinical interest of LMO2 testing for the diagnosis of aggressive large B-cell lymphomas	87
3.3 Tercer treball:	89
Lack of expression of LMO2 clone SP51 identifies MYC rearrangements in aggressive large B-cell lymphomas	103
4. Discussió	117

4.1 Discussió conjunta.....	119
4.2 Futures línies de recerca i altres consideracions	125
5. Conclusions	127
6. Bibliografia.....	131
7. Annex.....	145

Llista d'abreviacions

aa-IPI: IPI ajustat a l'edat (de l'anglès, *age-adjusted International prognostic index*)

ABC-DLBCL: limfoma difús de cèl·lules B grans, perfil cèl·lula B activada (de l'anglès, *activated B-cell like diffuse large B-cell lymphoma*)

ARF: proteïna supressora tumoral ARFO

BCL2: gen de la cèl·lula B de la Leucèmia/limfoma limfocítica crònica 2 (de l'anglès, *B-cell CLL/Lymphoma 2*)

BCL2⁺: expressió immunohistoquímica de BCL2 positiva

BCL2^{-/w}: expressió immunohistoquímica de BCL2 negativa o feble

BCL6: gen de la cèl·lula B de la Leucèmia/limfoma limfocítica crònica 6 (de l'anglès, *B-cell CLL/Lymphoma 6*)

BCL-X_L: *BCL2-like 1*

BL: limfoma de Burkitt (de l'anglès, *Burkitt lymphoma*)

BLIMP1: *B-lymphocyte-induced maturation protein 1*

BLL-11q: limfoma Burkitt-like amb aberracions del cromosoma 11q (de l'anglès, *Burkitt-like lymphoma with 11q aberration*)

CD: grup de diferenciació (de l'anglès, *cluster of differentiation*)

CD10⁺: expressió immunohistoquímica de CD10 positiva

CD10⁻: expressió immunohistoquímica de CD10 negativa

cDNA: àcid desoxiribonucleic complementari (de l'anglès, *complementary deoxyribonucleic acid*)

CLL: leucèmia/limfoma limfocítica crònica (de l'anglès, *chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma*)

CHOP: ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, prednisona [de l'anglès, *cyclophosphamide, doxorubicin hydrochloride (hydroxydaunomycin), vincristine sulfate (Oncovin®), prednisone*]

COO: cèl·lula d'origen (de l'anglès, *cell of origin*)

CSR: recombinació canvi de classe de les immunoglobulines (de l'anglès, *class switch recombination*)

DC: casos dissociats (de l'anglès, *dissociated-cases*)

DE-DLBCL: limfoma difús de cèl·lules B grans doble expressor (de l'anglès, *double-expressor diffuse large B-cell lymphoma*)

DFS: supervivència lliure de malaltia (de l'anglès, *disease free survival*)

DH: limfoma amb reordenaments de *MYC* i *BCL2* o *BCL6* (de l'anglès, *double-hit lymphoma*)

DLBCL, NOS: limfoma difús de cèl·lules B grans; no especificat (de l'anglès, *diffuse large B-cell lymphoma, not otherwise specified*)

DNA: àcid desoxiribonucleic (de l'anglès, *deoxyribonucleic acid*)

DZ: zona fosca del centre germinal (de l'anglès, *dark zone*)

ECOG: Grup Oncològic Cooperatiu de l'Est (de l'anglès, *Eastern Cooperative Oncology Group*)

FISH: hibridació in situ per fluorescència (de l'anglès, *fluorescence in situ hybridization*)

FL: limfoma fol·licular (de l'anglès, *follicular lymphoma*)

FL-DH: limfoma fol·licular amb reordenaments del gen *MYC* i *BCL2* (de l'anglès *follicular lymphoma double-hit*)

FOXP1: factor de transcripció FOXP1 (de l'anglès, *forkhead transcription factor P1*)

GC: centre germinal (de l'anglès, *germinal center*)

GCB-DLBCL: limfoma difús de cèl·lules B grans, perfil cèl·lula B centre germinal (de l'anglès, *germinal center B-cell like diffuse large B-cell lymphoma*)

GEP: perfil d'expressió gènica (de l'anglès, *gene expression profile*)

HGAL: *human germinal center-associated lymphoma*

HGBL: limfoma B d'alt grau (de l'anglès, *high grade B lymphoma*)

ID3: inhibidor de la proteïna de unió del ADN ID3 (de l'anglès, *inhibitor of DNA-binding/differentiation proteins*)

IG: immunoglobulines

IGA: immunoglobulina classe A

IGG: immunoglobulina classe G

IGH: gen de les cadenes pesades de les immunoglobulines

IGM: immunoglobulina classe M

IPI: índex pronòstic internacional (de l'anglès, *international prognostic index*)

IRF4/MUM1: factor regulador de l'interferó 4/oncogen del mieloma múltiple 1 (de l'anglès, *interferon regulatory factor 4 protein/ multiple myeloma oncogene 1*)

κ: cadena lleugera de les immunoglobulines *Kappa*

LBCL: limfoma/limfomes B agressius (de l'anglès, *large B-cell lymphoma*)

LDH: lactat deshidrogenasa

LMO2 (TTG2 o RBTN2): *hematopoietic transcription factor Lim domain only protein 2*

LMO2⁺ : expressió immunohistoquímica de LMO2 positiva

LMO2⁻: expressió immunohistoquímica de LMO2 negativa

LPL: limfoma limfoplasmacític (de l'anglès, *lymphoplasmacytic lymphoma*)

LR: raó de versemblança (de l'anglès, *likelihood ratio*)

LZ: zona clara del centre germinal (de l'anglès, *light zone*)

λ : cadena lleugera de les immunoglobulines *Lambda*

MAX: *MYC-associated protein X*

mBL: perfil molecular del limfoma Burkitt

MCL: limfoma del mantell (de l'anglès, *mantle cell lymphoma*)

MDM2: gen doble minuto murino 2 (de l'anglès, *murine double minute-2*)

mi-RNA: micro-RNA

mRNA: àcid ribonucleic missatger (de l'anglès, *messenger ribonucleic acid*)

MO: moll d'os o medul·la òssia

MYC: *c-MYC avian myelocytomatosis viral oncogen homolog*

MYC⁺: expressió immunohistoquímica de MYC positiva

MYC-A: amplificació del gen *MYC*

MYC-G: guany de nombre de còpies del gen *MYC*

MYC-N: gen *MYC* no reordenat

MYC-R: reordenament del gen *MYC*

MYD88: gen de la *proteïna 88 de resposta primària de diferenciació mieloide* (de l'anglès, *myeloid differentiation response protein 88*)

MZL: limfoma de la zona marginal (de l'anglès, *marginal zone lymphoma*)

NF- κ B: factor nuclear kappa B (de l'anglès, *nuclear factor kappa B*).

No-GCB-DLBCL: limfoma difús de cèl·lules grans B amb perfil immunohistoquímic no centre germinal (de l'anglès, *non-germinal center B-cell like diffuse large B-cell lymphoma*)

NPV: valor predictiu negatiu (de l'anglès, *negative predictive value*)

OS: supervivència global (de l'anglès, *overall survival*)

p21: inhibidor de cinasa ciclina-dependent p21

p27^{KIP1}: inhibidor de cinasa ciclina-dependent p27 (també conegut com KIP1)

PD-L1: lligand 1 de mort programada (de l'anglès, *programmed death-ligand 1*)

PFS: progressió lliure de malaltia (de l'anglès, *progression free survival*)

PPV: valor predictiu positiu (de l'anglès, *positive predictive value*)

vs.: versus

qPCR: reacció en cadena de la polimerasa en temps real (de l'anglès, *quantitative polymerase chain reaction*)

R-CHOP: rituximab + CHOP

RNA: àcid ribonucleic (de l'anglès, *ribonucleic acid*)

SH: limfoma amb reordenament de *MYC*, com a única alteració citogenètica (de l'anglès, *single-hit lymphoma*)

SHM: hipermutació somàtica (de l'anglès, *somatic hypermutation*)

SNC: sistema nerviós central

tDLBCL: limfoma difús de cèl·lules grans B transformat (de l'anglès, *transformed diffuse large B-cell lymphoma*)

T-ALL: leucèmia limfoblàstica aguda T (de l'anglès, *T-cell acute lymphoblastic leukaemia*)

TCF3 (E2A): factor de transcripció E2-alfa (de l'anglès, *E2A Immunoglobulin Enhancer Binding Factors E12/E47*)

TdT: desoxinucleotidil transferasa terminal (de l'anglès, *terminal deoxynucleotidyl transferase*)

TFH: cèl·lules T de fenotip fol·licular helper

TH: limfoma amb reordenament de *MYC* i *BCL2* i *BCL6* (de l'anglès, *triple-hit lymphoma*)

TMA: tissue microarray

TP53: gen de la proteïna supressora tumoral p53 (de l'anglès, *tumor protein p53*)

VEB: virus d'Epstein-Barr

VIH: virus de la immunodeficiència humana

WES: seqüenciació de l'exoma complet (de l'anglès, *whole exome sequencing*)

WHO: organització mundial de la salut (de l'anglès, *World Health Organization*)

WTS: secció de teixit complet (de l'anglès, *whole tissue section*)

Lista de figures

- Figura 1. Representació esquemàtica d'un fol·licle limfoide secundari.
- Figura 2. Representació esquemàtica de la caracterització immunohistoquímica dels limfòcits B.
- Figura 3. Representació esquemàtica de l'origen dels limfomes que deriven del GC.
- Figura 4. Algoritme de Hans (Hans CP, 2004).
- Figura 5. Alteracions genètiques descrites en els DLBCL en relació a COO.
- Figura 6. Factors pronòstics en els DLBCL.
- Figura 7. Algoritme diagnòstic en el diagnòstic diferencial dels LBCL.
- Figura 8. Esquema de l'expressió i regulació de MYC en la formació del GC.
- Figura 9. Dianes de MYC relacionades amb la transformació dels limfomes i agressivitat.
- Figura 10. Sondes de FISH per l'estudi de reordenaments de MYC.
- Figura 11. Sondes de FISH per l'estudi d'altres alteracions del gen MYC.
- Figura 12. Localització del gen LMO2 i funcions. Paper de LMO2 en el desenvolupament murí.
- Figura 13. Representació esquemàtica del complex proteic LMO2 en les cèl·lules de línia cel·lular de DLBCL.
- Figura 14. (Annex, apartat 7) Arbre indicant la probabilitat de reordenament de MYC en LBCL basat en l'expressió immunohistoquímica de CD10 i LMO2.
- Figura 15. (Annex, apartat 7) Cas exemple: DLBCL, CD10⁺ LMO2⁻ amb translocació de MYC.
- Figura 16. (Annex, apartat 7) Utilitat de l'expressió de LMO2 per diferenciar BLL-11q i BL.

Llista de taules

Taula 1. Limfomes B agressius, actualització de la classificació de la WHO, 2016.

Taula 2. Visió general de les principals alteracions genètiques en els subtipus de DLBCL, GCB-DLBCL i ABC-DLBCL.

1. Introducció

1.1 Teixits limfoides. Generalitats

Els teixits limfoides són els òrgans on les cèl·lules immunes resideixen, proliferen i es diferencien. Es divideixen en primaris i secundaris o perifèrics, depenent de la funció i estadi maduratiu de les cèl·lules que els constitueixen.

Els teixits limfoides primaris són la medul·la òssia [o moll d'os (MO)] i el timus. Són on trobem les cèl·lules limfoides precursors i on té lloc la diferenciació independent d'antigen. En el MO es generen limfòcits immadurs B i T i es produeix el primer procés de diferenciació de les cèl·lules B: el reordenament dels segments variables V (*variable*), D (*diversity*) i J (*joining*) dels gens de les immunoglobulines (IG). Els limfòcits T immadurs formats al MO van cap al timus on es produiran els primers processos de diferenciació amb el reordenament del gen receptor de la cèl·lula T (TCR).

La resposta immunològica té lloc al teixit limfoide secundari, que inclou els ganglis limfàtics, la melsa i el teixit limfoide associat a les mucoses (MALT), que és un teixit que revesteix el tracte respiratori, gastrointestinal i gènito-urinari. En aquests òrgans, les cèl·lules B i T s'enfronten als antígens i tindrà lloc la diferenciació antigen depenent de les cèl·lules B.

1.2 Histologia del gangli limfàtic

En el gangli limfàtic diferenciem dues parts: una d'externa o còrtex i una d'interna o medul·la. La part més externa, a la vegada, es subdivideix en còrtex extern (o àrea de cèl·lules B) i el paracòrtex, on trobem també cèl·lules T.

ÀREES B DEL GANGLI LIMFÀTIC

Constituïdes principalment per agregacions fol·liculars de cèl·lules B. En el gangli limfàtic no estimulat es presenten com a col·leccions esfèriques denominades fol·licles limfoides primari, constituïts per limfòcits B petits en repòs (cèl·lules *naïve* procedents del MO que expressen tant IGM com IGD de superfície (sIGM; sIGD) i cèl·lules fol·liculars dendrítiques. Després de l'exposició a l'antigen es formen els fol·licles limfoides secundaris on diferenciem una zona externa o mantell, que envolta el centre germinal (GC). El GC conté blasts B grans

(centreblasts que no expressen sIGD i poca sIGM), centròcits, una minoria de cèl·lules T, macròfags de “cos tangible” i una xarxa de cèl·lules fol·liculars dendrítiques.

Al GC diferenciem, histològicament, dues àrees, que a més tenen diferent funció: una àrea fosca (DZ) i una de clara (LZ). A la DZ (zona proliferativa) trobem predominantment centreblasts que estan proliferant i que a més, pateixen un gran nombre de mutacions en la regió V del gen de les IG [*somatic hypermutation* (SH)], aconseguint, d'aquesta manera una gran variabilitat de les IG produïdes. Els centreblasts es diferencien a centròcits, localitzats a la LZ del centre germinal (àrea de selecció). En aquesta zona els centròcits experimenten un canvi d'isotip de les IG [*class switch recombination* (CSR)], de manera que passaran de ser IGM a IGG o IGA principalment. Els centròcits que no tinguin afinitat per l'antigen moren per apoptosi, essent captats com “cos tangible” pels macròfags. Alguns centròcits supervivents evolucionaran i donaran lloc a les cèl·lules de memòria, que es localitzaran a la zona del mantell, i altres es diferenciaran a plasmoblasts, que migren als cordons medul·lars per a convertir-se en cèl·lules plasmàtiques (Figura 1).

En alguns òrgans limfoides secundaris o en alguns territoris limfàtics podem reconèixer una zona externa al mantell anomenada zona marginal. Aquesta està constituïda per una barreja de limfòcits B *naïve* i limfòcits B de memòria.

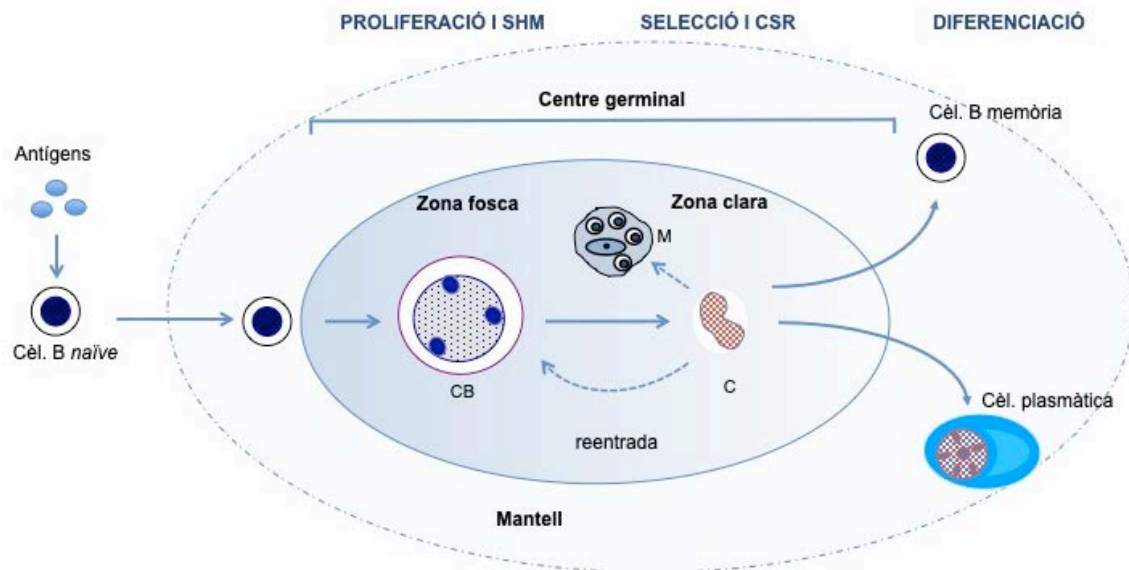


Figura 1. Representació esquemàtica d'un fol·licle limfoide secundari. Adaptat de Basso *et al.* (Basso K, 2015). Després de l'exposició a un antígen es formen els fol·licles limfoides secundaris on es produeix la proliferació i la selecció dels limfòcits B.

SHM: hipermutació somàtica; CSR: recombinació canvi de classe de les immunoglobulines; M: macròfag de cos 'tangible'; CB: centreblast; C: centròcit.

ÀREES T DEL GANGLI LIMFÀTIC

Les cèl·lules T estan confinades principalment a la regió paracortical (o timo-dependent).

1.3 Caracterització immunohistoquímica dels limfòcits B

El perfil immunohistoquímic que expressen els limfòcits B ens indica l'estat de maduració i diferenciació d'aquests. Els limfòcits B *naïve*, a part d'expressar marcadors de línia B, també expressen IGM, IGD, BCL2, CD23, CD21 i ocasionalment co-expressen CD5. Després de ser estimulats per l'antigen i la cèl·lula T, aquestes cèl·lules entren al GC on expressen CD10 i BCL6 i són BCL2 negatives (BCL2⁻). Un cop es produeixen els fenòmens de SH i CSR, els centròcits perden expressió de BCL6 i surten del GC. La diferenciació del centròcit a cèl·lula plasmàtica o cèl·lula B de memòria necessita de l'expressió dels factors **IRF4/MUM1** (*multiple myeloma oncogene 1/ interferon regulatory factor 4 protein*) i **BLIMP1** (*B-lymphocyte-induced maturation protein 1*) i la inhibició de BCL6 (Kuo TC, 2007). Les cèl·lules post-GC (cèl·lula de memòria i cèl·lula plasmàtica) són les darreres en la diferenciació de la cèl·lula B. En el cas

de les cèl·lules plasmàtiques, expressen CD79a, CD38, CD138 i cadenes lleugeres i són CD20 negatives (Figura 2).

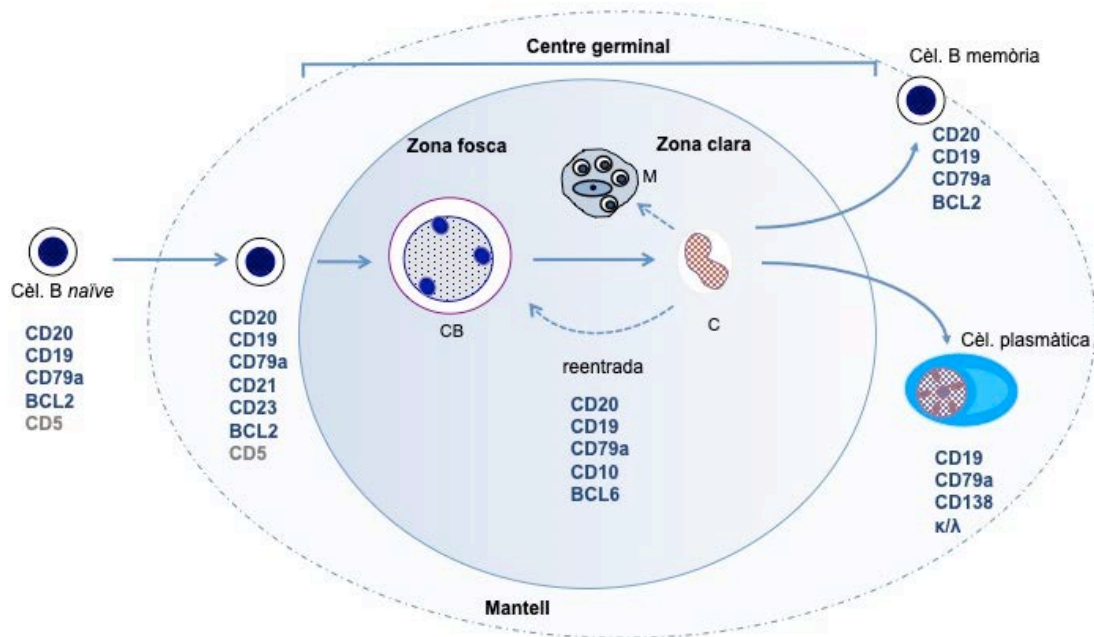


Figura 2. Representació esquemàtica de la caracterització immunohistoquímica dels limfòcits B. Adaptat de Basso *et al.* (Basso K, 2015). Els limfòcits B expressen diferents CD i proteïnes segons l'estadiatge de diferenciació en què es troben.

1.4 Alteracions de la cèl·lula B: desenvolupament de limfoma

Cada estadi del desenvolupament d'un limfòcit B normal, representats a la Figura 2, té una contrapartida maligna, és a dir, cada tipus de limfoma B s'origina, per tant, d'una cèl·lula B no tumoral que es troba en un estadi de diferenciació determinat, identificant-se una expansió d'un subclon específic. La valoració morfològica/citològica així com l'aplicació d'estudis complementaris (com la immunohistoquímica, citometria de flux, estudis citogenètics i moleculars i d'expressió gènica) han demostrat la semblança de la cèl·lula tumoral amb la seva cèl·lula d'origen (COO) no tumoral.

1.5 Limfomes B agressius

1.5.1 Definició i classificació de la OMS

Els limfomes B agressius (LBCL, de l'anglès *large B-cell lymphoma*) inclouen nombroses neoplàsies de cèl·lules B madures i de precursors limfoides B

[leucèmia/limfoma limfoblàstic, no especificat (NOS) i la leucèmia/limfoma limfoblàstic B amb alteracions genètiques recurrents]. Les primeres corresponen a un grup heterogeni amb diferents característiques biològiques i patològiques així com un ampli espectre de manifestacions clíniques. Són lesions que es caracteritzen per una proliferació neoplàsica de cèl·lules B de mida mitjana-gran, en les que el nucli presenta una mida igual o més gran a un histiòcit i que creixen de manera difusa (Swerdlow SH C. E., 2017).

Engloba, entre altres, el limfoma difús de cèl·lules B grans (DLBCL), limfoma de Burkitt (BL) i, els recentment incorporats a la classificació de la OMS, el limfoma B d'alt grau, no especificat (HGBL, NOS) i el HGBL amb translocacions de *MYC* i *BCL2* i/o *BCL6* (HGBL-DH/TH).

El DLBCL inclou un gran nombre d'entitats amb morfologia, fenotip, troballes moleculars i comportament clínic diferents i correspon al 30-40% dels limfomes no Hodgkin diagnosticats (Taula 1).

LARGE B-CELL LYMPHOMAS
Diffuse large B-cell lymphoma, not otherwise specified (NOS)
Germinal center B-cell type (GCB)
Activated B-cell type (ABC)
T-cell/histiocyte-rich large B-cell lymphoma
DLBCL, topographic site related
Primary mediastinal (thymic) large B-cell lymphoma
Primary DLBCL of the CNS
Primary cutaneous DLBCL, leg type
Intravascular large B-cell lymphoma
DLBCL, EBV-related
EBV-positive DLBCL, NOS
DLBCL associated with chronic inflammation
Lymphomatoid granulomatosis
LBCL with terminal B-cell differentiation
Plasmablastic lymphoma
ALK-positive large B-cell lymphoma
Primary effusion lymphoma
HHV8+ DLBCL, NOS
Burkitt lymphoma
Burkitt-like lymphoma with 11q aberrations
High grade B-cell lymphoma
High-grade B-cell lymphoma with <i>MYC</i> and <i>BCL2</i> and/or <i>BCL6</i> rearrangements
High-grade B-cell lymphoma, NOS
B-cell lymphoma, unclassifiable with features intermediate between diffuse large B-cell lymphoma and classic Hodgkin lymphoma

Taula 1. Limfomes B agressius, actualització de la classificació de la WHO, 2016.

1.5.2 Limfoma difús de cèl·lules B grans, no especificat (DLBCL,NOS)

GENERALITATS

El DLBCL, NOS és el més freqüent de la categoria anteriorment esmentada, corresponent al 80% de tots els LBCL (Campo E, 2017). És un grup de neoplàsies que inclou tumors que no poden ser classificats en cap de les altres entitats específiques.

La majoria s'originen *de novo* però en alguns casos esdevenen com a progressió o transformació d'un limfoma de baix grau. L'etiologia és desconeguda, però en determinats casos es troben factors predisponents [estats d'immunosupressió, congènita o adquirida, o associats a infecció per virus d'Epstein-Barr (VEB)].

PRESENTACIÓ CLÍNICA

És més freqüent en gent d'edat avançada (setena dècada de la vida), malgrat poder afectar qualsevol edat i amb un lleu predomini del sexe masculí. Clínicament els pacients presenten freqüentment múltiples adenopaties i/o afectació extraganglionar, a vegades acompanyat de símptomes B o d'altres, depenent de la localització de l'afectació. Tant l'afectació de sang perifèrica com la del MO és poc freqüent. Aquesta última es pot veure en un 10-20% dels casos. En cas d'afectació del MO, pot ser morfològicament discordant (Swerdlow SH, 2017).

ESTUDI MORFOLÒGIC

L'estudi histològic posa de manifest la presència d'una proliferació atípica que esborra l'arquitectura del teixit afecte, parcialment o total. En el gangli limfàtic, és freqüent l'afectació del teixit periganglionar. Des del punt de vista citològic, les tres variants morfològiques més freqüents són la centroblàstica, immunoblàstica i anaplàstica, essent la primera la més habitual. La variant immunoblàstica es reserva per aquells casos en què la lesió està constituïda per >90% de cèl·lules amb aquesta morfologia, associant-se aquesta a reordenaments del gen *MYC* i a un pitjor pronòstic (Engelhard M, 1997) (Ott G, 2010) (Horn H, 2015) (Sarkozy C, 2015). A la variant anaplàstica s'identifiquen cèl·lules grans/molt grans,

semblant a un limfoma anaplàstic de cèl·lula gran o bé un carcinoma indiferenciat.

PERFIL IMMUNOFENOTÍPIC

Immunofenotípicament, no hi ha un perfil característic si bé, els marcadors de línia B són positius en la majoria de casos i els de línia T negatius, a excepció del CD5, que pot expressar-se en fins un 10% dels casos. L'expressió de marcadors de GC (CD10, BCL6), BCL2 i IRF4/MUM-1 és variable així com l'expressió de MYC (entre un 30%-50% dels DLBCL, NOS) (O'Malley DP, 2015). Entre un 10% i un 21% poden expressar CD30 (alguns corresponen a variants anaplàstiques), determinació interessant donat que constitueix una nova diana terapèutica. Altres marcadors que poden expressar són FOXP1, en un 20% dels DLBCL, NOS que no expressen marcadors de centre germinal, i *hematopoietic transcription factor LIM domain only 2* (LMO2) en un 50% aproximadament i que es correlaciona amb marcadors de GC (Natkunam Y Z. S., 2007) (Agostinelli C, 2012). L'índex proliferació, valorat amb el Ki-67, és variable (entre el 40-90%).

CÈL·LULA D'ORIGEN

El DLBCL, NOS deriva de cèl·lules B madures que presenten un estat de diferenciació GCB o post-GCB, fet recolzat per la demostració que els GCB-DLBCL i els post-GCB-DLBCL tenen perfils d'expressió gènica diferents. La sobreexpressió de CD10 i BCL6 s'associa a la COO de GC (Figura 3).

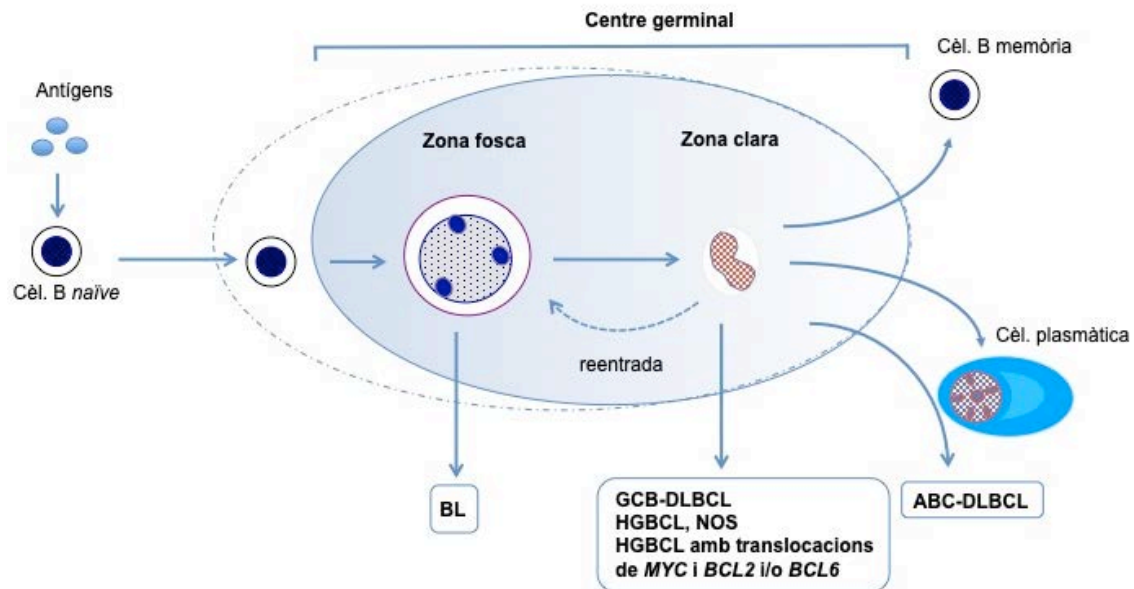


Figura 3. Representació esquemàtica de l'origen dels limfomes que deriven del GC. Adaptat de Basso *et al.* (Basso K, 2015). La COO dels GCB-DLBCL i els HGBCL, NOS i els HGBCL amb translocacions de *MYC* i *BCL2* i/o *BCL6* seria una de la zona clara. Els ABC-GCBCL mostren característiques de cèl·lula GCB en un estadi més tardà (plasmablasts) que està compromesa a una diferenciació a cèl·lula plasmàtica. En canvi, el BL s'originaria d'una cèl·lula provinent de la DZ.

SUBTIPUS MOLECULARS DESCRITS EN ELS DLBCL, NOS

S'han publicat diferents estudis en referència a la complexitat molecular d'aquesta entitat. Alizadeh *et al.*, utilitzant teixit tumoral congelat i utilitzant la tecnologia d'arrays d'expressió gènica van identificar dos subtipus moleculars diferents segons patrons d'expressió gènica i els va relacionar amb la cèl·lula d'origen (COO):

- **SUBGRUP GCB-DLBCL:** que presenten una alta expressió de gens que normalment s'expressen en el GC; deriva de cèl·lules B centre germinal i que presenten sobreexpressió de *BCL6* i *CD10*. Aquest grup, per tant, té un patró d'expressió gènica similar al de les cèl·lules B del GC.
- **SUBGRUP ABC-DLBCL:** activen gens necessaris per a la diferenciació plasmablàstica i per tant, sembla que deriven de plasmablasts. Presenten un patró similar al de les cèl·lules B activades de sang perifèrica.

No obstant, aproximadament, un 10-15% dels casos no es poden incloure en cap d'aquests dos grups, sent **NO CLASSIFICABLES** (Alizadeh AA, 2000).

Amb la incorporació de noves tècniques moleculars [la seqüenciació de l'exoma complet (WES), l'anàlisi de còpies gèniques i la seqüenciació del RNA (RNA-

seq]] s'han descrit nous subgrups moleculars de DLBCL. La utilitat clínica d'aquesta classificació genètica és evident donat la relació dels subgrups a la resposta al tractament (Schmitz R, 2018) (Chapuy B, 2018) (Wright GW, 2020).

Donat que els estudis d'expressió gènica utilitzaven teixit tumoral en fresc i/o congelat, ràpidament es van desenvolupar diferents algoritmes immunohistoquímics sobre teixit parafinat per tal de poder aproximar-se a aquesta classificació i aplicar-los a la pràctica clínica, amb una concordança amb els estudis genètics variable (Hans CP, 2004), (Colomo L, 2003) (Choi WW, 2009) (Meyer PN, 2011) (Visco C, 2012) (Gutierrez-Garcia G, 2011). D'aquests estudis, l'algoritme de Hans és el que s'ha utilitzat i referenciat més en la literatura, i utilitza una terminologia de classificació dual GCB-DLBCL i no-GCB-DLBCL (que inclou els ABC-DLBCL i els no classificables). Aquest algoritme, utilitzant tres marcadors, (CD10, BCL6 i IRF4/MUM-1), mostra una concordança amb els estudis GEP d'entre el 80-86% (Figura 4). L'actual classificació de la WHO recomana la identificació de la COO en tots els casos DLBCL, NOS i accepta l'aproximació mitjançant l'estudi immunohistoquímic.

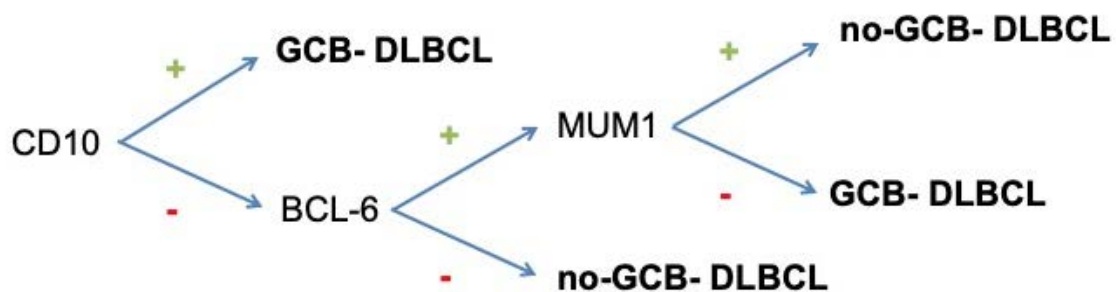


Figura 4. Algoritme de Hans (Hans CP, 2004).

En els darrers anys s'ha desenvolupat una tècnica d'expressió gènica a partir de RNA extret de teixit parafinat. Aquesta tècnica, basada en l'expressió de 20 gens, permet identificar els subtipus moleculars de DLBCL amb una concordança >95% amb els mètodes per GEP publicats prèviament (Scott DW, 2014).

La determinació de la COO per mètodes moleculars o per marcadors immunohistoquímics indirectes té implicacions biològiques, pronòstiques i terapèutiques doncs els DLBCL amb perfil ABC/no-GCB tenen pitjor pronòstic

tot i la introducció de rituximab en l'estratègia terapèutica, i semblen més sensibles a ibrutinib (Wilson WH, 2015).

PERFELS MUTACIONALS DELS DLBCL,NOS

Aquesta heterogeneïtat diferent dels DLBCL, NOS pot estar relacionada amb el perfil genètic i de mutacions que presenten els dos subtipus anteriorment descrits, donat que algunes d'aquestes alteracions en donen més en un grup que en un altre. En els DLBCL, NOS s'han identificat nombroses **alteracions genòmiques**, que inclouen aberracions en el nombre de còpies de gens, mutacions, translocacions i amplificacions, que poden conduir a alteracions en l'expressió proteica d'aquests gens (Figura 5) (Taula 2) (Ngo VN, 2011) (Pasqualucci L, 2011) (Gomes M, 2014) (Intlekofer AM, 2014) (Pasqualucci L, 2015) (Testoni M Z. E., 2015) (Korkolopoulou P, 2016) (Muppidi JR, 2014) (Davis RE, 2001) (Iqbal J N. V., 2006).

- ALTERACIONS GENÈTIQUES CARACTERÍSTIQUES DE GCB-DLBCL

Els GCB-DLBCL es caracteritzen per translocacions de **BCL2** (entre 35-45%) i de **MYC** (5-15%). La primera d'elles resulta en una transcripció de *BCL2* alterada, comportant una sobreexpressió de BCL2 i, per tant, un augment de la supervivència de la cèl·lula. Aquesta translocació és pràcticament indetectable en els ABC-DLBCL. Altres alteracions descrites en *BCL2* són les mutacions, també pràcticament exclusives de GCB-DLBCL, degudes a hipermutacions somàtiques aberrants i s'associen a la t(14;18).

Altres alteracions recurrents en els GCB-DLBCL es troben en **PTEN** i són delecions (~10%) i mutacions (3-22%) que produeixen activació de la via PI3K/AKT, que juga un paper important en la proliferació, supervivència i creixement cel·lular. També s'han identificat mutacions en **EZH2** (~22%), sobretot en els casos en què es detecta la translocació *BCL2/IGH*, i també en la via **Gα13** (~20%) que regula el creixement i confinament local de les cèl·lules B GC.

Per últim, amplificacions de **MDM2** s'han identificat en el 10% dels GCB-DLBCL, resultant en una regulació negativa de *p53*.

- ALTERACIONS GENÈTIQUES CARACTERÍSTIQUES DE ABC-DLBCL

Els ABC-DLBCL s'associen a activació de la via **NF-κB**, identificant-se en pràcticament el 100% d'aquest subtipus i que promou la supervivència cel·lular, la proliferació i la inhibició de l'apoptosi. S'han trobat diferents mecanismes que produeixen aquesta activació. Per exemple, **MYD88** està mutat en el 30% dels casos i produeix una activació constitutiva d'aquesta via. Mutacions activadores de **CARD11** i/o en **CD79B** i **CD79A** activen de manera crònica el receptor de cèl·lula B (BCR) i la via de **NF-κB**. Una altra via seria per mutacions o delecions inactivadores de **TNFAIP3** (regulador negatiu de **NF-κB**).

Alteracions addicionals en aquest grup són les amplificacions de **BCL2**, essent normalment la causa de la seva sobreexpressió en aquest subtipus; s'identifiquen en el 30-40% dels casos. També s'han descrit la deleció o pèrdua d'expressió del gen supressor tumoral **CDKN2** així com alteracions en la regulació de **PRDM1/BLIMP1**, el principal regulador de la diferenciació a cèl·lula plasmàtica.

- ALTERACIONS GENÈTIQUES COMPARTIDES

Tot i que s'han descrit en tots dos subtipus, mutacions en **CREBBP**, **EP300**, **MLL2** i **MLL3** són més freqüents en GBC que en ABC. Les dues primeres són responsables de l'acetilació de **BCL6** i **TP53** i la seva mutació condueix a una activació constitutiva de **BCL6** i una disminució de l'activitat de **TP53**, contribuint al desenvolupament de limfomes. També comparteixen mutacions de gens relacionats amb la vigilància immune (**B2M**, **CD58**) i del cicle cel·lular i apoptosi com **FOXO1** (aquest últim es detecta en ~8-10% dels DLBCL, NOS) i s'associen a un comportament biològic més agressiu.

p53 és una proteïna supressora tumoral responsable de mantenir l'estabilitat genòmica induint apoptosi o bé mantenint la cèl·lula en fase G1 del cicle cel·lular en els casos en què l'ADN no és reparat. L'alteració de la funció d'aquesta proteïna produeix creixement cel·lular anormal, augment de la supervivència cel·lular, inestabilitat genètica i, en ocasions, transformacions

malignes. Mutacions o delecions de **TP53** es troben en el 18-32% dels DLBCL, NOS.

Com s'ha comentat anteriorment, **BCL6** és un factor de transcripció necessari per a la formació del GC i actua com un repressor de la transcripció de gens implicats en l'apoptosi, en el control del cicle cel·lular, proliferació i diferenciació cel·lular, com són **MYC**, **BCL2**, **TP53**, **IRF4** i **BLIMP1**. Els reordenaments d'aquest gen són els més freqüents en els DLBCL, NOS (aproximadament un 30-40% dels casos), detectant-se sobretot en els que tenen un patró ABC-DLBCL en relació als GCB-DLBCL (24% vs. 10%), mentre que les mutacions es detecten en un 61% de DLBCL, més freqüentment a GCB-DLBCL que en ABC-DLBCL (>70 vs. 44%). Es produeix, per tant, una sobreexpressió constitutiva de **BCL6** i el manteniment d'un fenotip GC, així com una tolerància al dany del DNA i un bloqueig a la diferenciació terminal a cèl·lula plasmàtica, suggerint que el desenvolupament de limfomes mediat per **BCL6** pot utilitzar diferents mecanismes segons els subtipus molecular de DLBCL (Iqbal J, 2007).

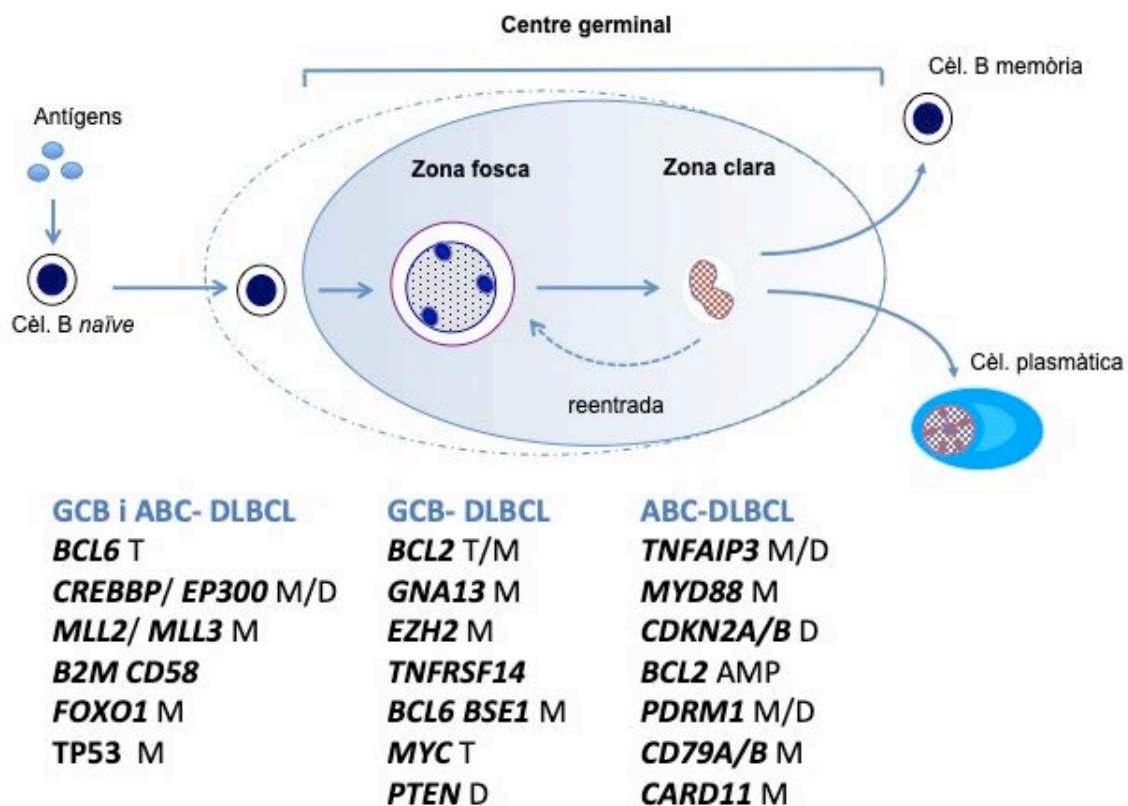


Figura 5. Alteracions genètiques descrites en els DLBCL en relació a COO. Adaptat de Basso *et al.* i Pasqualucci *et al.* (Basso K, 2015) (Pasqualucci L D.-F. R., 2015).

T: translocació; M: mutació; D: delecio, AMP: amplificació.

DLBCL SUBTYPE	RECURRENT TRANSLOCATIONS	MOST COMMON GENOMIC ABERRATIONS	MOST COMMON SOMATIC MUTATIONS
GCB	t(14;18)(q32;q21) 20-45% 8q24 rearrangements involving MYC, 20% 3q27 rearrangements involving BCL6, 10%	+1q, +2p16 (REL), +7q, +12q (MDM2), +13q31 (MIRHG1), -1p36 (TNFRSF14), -10q23 (PTEN), -13q34 (ING1), -17q (TP53)	Chromatin remodeling (EZH2, MLL2, MEF2B, EP300, CREBBP), TP53, BCL6 Regulatory region and other aberrant hypermutation targets
ABC	3q27 rearrangements involving BCL6, 25% rearrangements involving MYC, 5%	Trisomy 3 (FOXP1, NFKBIZ), +18q21 (BCL2, NFATC1), +19q13 (SPIB), -6q23 (TNFAIP3), -9q21(CDKN2A), -17p (TP53)	Chromatin remodeling (MLL2, EP300, CREBBP). BCR signaling & NF- κ B pathway (TNFAIP3, CARD11, CD79B, MYD88, TRAF2, TRAF3, TRAF5, MAP3K7, TNFRSF11A, ITPKB); PRDM1, BCL6 regulatory region and other aberrant somatic hypermutation targets, TP53
PMLBCL	3q27 rearrangements involving BCL6, 30% 16p13 rearrangements disrupting C/ITA and SOCS1, 40-45%	SOCS1, TNFAIP3, STAT6, BCL6 Regulatory regions and other ASHM targets	+2q16 (REL), +9p21 (JAK2, JMJ2C) -6q23 (TNFAIP3), -16p13 (SOCS1)

Taula 2. Visió general de les principals alteracions genètiques en els subtipus de DLBCL, GCB-DLBCL i ABC-DLBCL. Adaptat de Testoni *et al.* (Testoni M, 2015).

El paper de MYC en els LBCL es comenta més endavant (veure capítol 1.6).

FACTORS PRONÒSTIC

La comprensió de l'heterogeneïtat biològica del DLBCL, NOS ha permès identificar diversos marcadors pronòstics, tant clínics, immunohistoquímics com moleculars/genètics (Figura 6).

▪ VARIABLES CLÍNQUES

Dins les **variables clíniques**, l'índex pronòstic internacional (IPI) (Shipp MA H. D., 1993) (Ziepert M, 2010), segueix sent una eina fonamental per a determinar el pronòstic dels pacients afectes de limfomes agressius tractats amb quimioteràpia basada en antraciclins sense o amb immunoteràpia amb rituximab [ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina i prednisona \pm rituximab (CHOP/R-CHOP)]. Es basa en cinc variables clíniques (factors pronòstics independents) que són l'edat, el lactat deshidrogenasa (LDH) en sèrum elevat, Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) *performance status*, l'estadiatge d'Ann Arbor i l'afectació de territoris extra-ganglionars. Classifica els pacients, d'acord al nombre d'aquests factors pronòstics, en quatre grups de risc amb supervivència global (OS) als 5 anys de 73%, 51%, 43% i 26% respectivament. El valor pronòstic de l'IPI ha estat validat per a pacients amb DLBCL, NOS i s'han descrit altres variants com l'IPI ajustat a l'edat (aa-IPI) i l'IPI ajustat per a pacients tractats amb esquema R-CHOP (Nicolaidis C, 1998) (Wilder RB, 2002) (Sehn LH, 2007). Altres factors clínics a considerar i descrits són la presència de

masses tumorals (massa Bulky), el gènere, l'índex de massa corporal, els nivells de vitamina D i l'afectació del MO entre altres (Drake MT, 2010) (Bittenbring JT, 2014).

Malgrat la importància clínica de l'IPI, en tots els models clínics es detecta variabilitat en la supervivència entre pacients de grups pronòstics idèntics. Aquesta variabilitat és atribuïble a la heterogeneïtat tant genètica com molecular dels DLBCL, NOS, que contribueix al comportament biològic dels tumors. Alguns dels factors implicats es comenten seguidament.

- **MOLÈCULES REGULADORES DEL CICLE CEL·LULAR**

El **Ki-67** és un antigen nuclear que s'expressa en les cèl·lules en cicle cel·lular, i reflecteix la proporció de cèl·lules que estan proliferant. El seu significat pronòstic és controvertit en DLBCL, tot i que diferents estudis publicats en cohorts de pacients tractats amb R-CHOP demostren que una alta expressió de Ki-67 es relaciona amb menor OS i menor supervivència lliure de malaltia (DFS). No obstant, no hi ha un llindar determinat per a diferenciar alta i baixa expressió (Miller TP, 1994) (Li ZM, 2012) (Salles G, 2011).

Les mutacions de **TP53** s'han associat amb pitjor pronòstic en algunes síndromes limfoproliferatives [BL, leucèmia limfàtica crònica (CLL), limfoma del mantell (MCL)]. Les mutacions i delecions de **TP53** han mostrat estar associades també a DLBCL, igual que en les entitats esmentades prèviament i apareixen aproximadament en un 20% de DLBCL, NOS. Nombrosos estudis han demostrat que, en els DLBCL, NOS, constitueix un factor pronòstic advers (menor OS i/o DFS), aportant aquesta informació independentment de la COO. Altres estudis, però, no han pogut corroborar aquests resultats. Aquest poder predictiu variable de la mutació de **TP53** en els DLBCL, NOS podria atribuir-se a diferents metodologies emprades per a la seva detecció, ja que alguns estudis identifiquen aquesta mutació mitjançant estudis genòmics mentre altres utilitzen determinacions immunohistoquímiques. Altres alteracions de **TP53** són l'augment de nombre de còpies i alteracions en la regulació de moduladors d'aquest gen (Ichikawa A, 1997) (Zhang A, 1999) (Leroy K, 2002) (Sohn SK, 2003) (Maartense E, 2004), (Beà S, 2004) (Pasqualucci L T. V., 2011).

p21, és un inhibidor de cinasa ciclina-depenent, que participa en la regulació de la progressió del cicle cel·lular i la proliferació. També s'ha associat a pronòstic, de manera que, una alta expressió de p21 s'associa a menor proliferació i respostes favorables en pacients tractats amb rituximab (Winter JN, 2010).

p27^{KIP1} i **ciclina D3**, totes dues també molècules implicades en el cicle cel·lular. L'augment d'expressió d'aquestes també es relaciona amb disminució de OS i DFS la primera i una menor taxa de resposta completa i OS la segona (Sáez A, 1999) (Filipits M, 2002).

- **PROTEÏNES APOPTÒTIQUES**

BCL2, com s'ha comentat prèviament, és una proteïna antiapoptòtica. La seva sobreexpressió resulta tant de translocacions del gen com per amplifícacions o mutacions d'aquest. Entre un 47-58% dels DLBCL, NOS expressen BCL2. Si bé la presència de translocacions de *BCL2* no s'ha correlacionat amb el pronòstic dels pacients, la majoria d'estudis sí que demostren pitjor OS i DFS en aquells tumors amb una alta sobreexpressió (Kramer MH, 1996) (Li L, 2018).

L'expressió de **survivina**, membre de la família d'inhibidors de l'apoptosi, s'ha associat a un menor OS als 5 anys (Zhang Y, 2015).

- **MOLÈCULES IMPLICADES EN LA DIFERENCIACIÓ DE LA CÈL·LULA B**

Les translocacions i/o mutacions que afecten **BCL6** alteren la seva regulació i la seva expressió. Estudis publicats relacionant la presència de translocacions amb el pronòstic han generat resultats contradictoris. És possible que en alguns estudis, aquestes es relacionin amb una OS menor poder perquè es presenten més freqüentment en els ABC-DLBCL. Igualment, la presència de mutacions tampoc s'ha demostrat que tingui impacte pronòstic. En canvi, estudis d'expressió de mRNA o proteica sí que s'ha correlacionat amb una millor OS (Pescarmona E, 1997) (Jerkeman M, 2002) (Capello D, 2000) (Lossos IS J. K., 2001) (Barrans SL O. S., 2002).

Estudis d'expressió gènica han demostrat que l'expressió de **HGAL** és alta en el limfòcits B GC i cèl·lules B de memòria. La seva expressió és present en els processos limfoproliferatius derivats de GC. Estudis realitzats en cohorts de pacients amb DLBCL, NOS han demostrat que una alta expressió de HGAL mRNA és un predictor de OS (Lossos IS A. A., 2003).

CD5 és un antigen que s'expressa en cèl·lules T i en un petit subgrup de cèl·lules B. Es presenta en un 10% dels DLBCL, NOS i defineix una variant immunofenotípica (DLBCL CD5⁺), que s'associa a un curs clínic més agressiu i a un pitjor pronòstic (Harada S, 1999) (Ennishi D T. K., 2008) (Hyo R, 2010). Aquests subtipus de limfoma acostuma a tenir un perfil ABC-DLBCL (Salles G, 2011). Per contra, els DLBCL **CD30**⁺ s'associen a major OS i DFS als 5 anys, en pacients tractats amb R-CHOP, independentment de l'IPI (Hu S X.-M. Z., 2013) (Campuzano-Zuluaga G, 2013).

FOXP1 (*forkhead transcription factor P1*) és un factor de transcripció expressat en les cèl·lules B activades i més freqüentment en el subgrup de DLBCL, NOS amb fenotip no-GCB (Hans CP, 2004). Els DLBCL, NOS amb alta expressió d'aquest factor presenten, de manera significativa, una pitjor OS i una major tendència a la progressió, independentment de IPI, tot i que de manera no consistent en els estudis immunohistoquímics (Barrans SL F. J., 2004).

CD21 és un antigen que s'expressa tant en cèl·lules B *naïve* com en les cèl·lules fol·liculars dendrítiques. La seva expressió en DLBCL, NOS s'ha associat a millors índex de supervivència (Otsuka M, 2004).

- **FACTORS RELACIONATS AMB L'ANGIOGÈNESI**

Tant els factors antiangiogènics com el proangiogènics es poden detectar en sèrum i els seus nivells tenir un valor pronòstic.

Un d'aquests factors és **l'endostatina** que és un potent inhibidor de l'angiogènesi i del creixement tumoral *in vivo*. Nivells alts en sèrum s'han relacionat amb pitjor pronòstic en una sèrie de DLBCL tractats amb antracícilines (Bono P, 2003).

Un altre marcador relacionat amb el pronòstic és **HIF-1 α** (*hypoxia-inducible factor 1 α*), regulador principal de l'angiogènesi relacionada amb hipòxia. Es va observar que pacients tractats amb R-CHOP i amb una alta expressió immunohistoquímica de HIF-1a presentaven un millor pronòstic, conclusió que no es va poder demostrar en pacients tractats amb CHOP (Evens AM, 2010) (Jin J, 2018).

- **MOLÈCULES D'ADHESIÓ**

Nivells alts en sèrum de **ICAM-1** i **CD44** s'han associat a una OS inferior en pacients amb DLBCL, NOS (Terol MJ, 2003) (Ristamaki R, 1994).

- **EXPRESSIÓ IMMUNOHISTOQUÍMICA**

Tot i que s'han comentat alguns d'ells, com el CD5, darrerament, s'han estudiat els **DLBCL expressors dobles** (DE-DLBCL, double-expressing lymphoma o double protein-expressing lymphoma). Els DE-DLBCL són DLBCL, NOS que co-expressen, des del punt de vista immunohistoquímic, MYC i BCL2, definint els punts de tall de MYC⁺ $\geq 40\%$ i per BCL2, la recomanació és BCL2⁺ $> 50\%$ de cèl·lules positives (Swerdlow SH C. E., 2016). Els DE-DLBCL corresponen al 20-30% dels DLBCL i la majoria pertanyen al subgrup no-GCB-DLBCL (Riedell PA, 2018) (Green TM Y. K., 2012). Comparant-los amb els DLBCL, NOS que únicament expressen MYC o no sobreexpressen cap de les dues proteïnes, s'associen a pitjor OS en la majoria d'estudis, tot i la variabilitat en els punts de tall establerts per a la seva valoració en les diferents articles publicats (Horn H Z. M., 2013) (Johnson NA S. G., 2012) (Green TM Y. K., 2012) (Hu S X.-M. Z., 2013) (Perry AM A.-B. Y., 2014). Aquesta pitjor supervivència també podria estar relacionada amb les característiques clíniques dels pacients. Green *et al*, en un estudi retrospectiu i, definint DE-DLBCL com MYC⁺ $\geq 40\%$ i BCL2⁺ $> 70\%$, van observar que els pacients amb un DE-DLBCL presentaven valors d'IPI intermedi/alt o alt (eren d'edat avançada, presentaven pitjor *performance status*, i malaltia més avançada amb afectació extraganglionar múltiple), un índex de proliferació Ki-67 més alt i taxes de resposta completa a quimioteràpia amb R-CHOP menors. Per tant, la co-expressió de MYC/BCL2 a més de ser un factor predictor de escassa resposta a R-CHOP, també identifica un subgrup de

DLBCL, NOS amb baixes taxes de resposta a altres règims terapèutics així com al trasplantament autòleg de cèl·lules mare (Green TM Y. K., 2012).

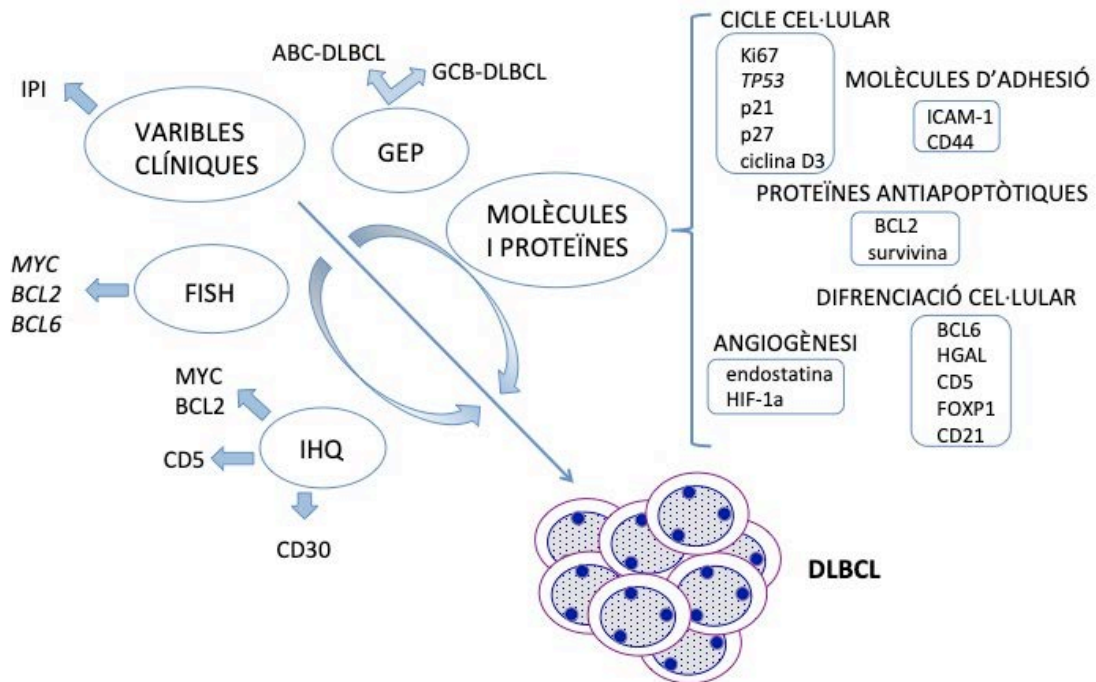


Figura 6. Factors pronòstics en els DLBCL. Adaptat de Lossos *et al.* (Lossos IS M. D., 2006). Resum d'alguns dels múltiples factors pronòstics descrits en els DLBCL, NOS.

1.5.3 Limfoma de Burkitt (BL)

GENERALITATS

És un limfoma molt agressiu però curable, constituït per cèl·lules B de mida intermèdia, amb citoplasma basòfil i un índex mitòtic alt.

Es reconeixen tres variants, amb distribució geogràfica, presentació clínica, troballes biològiques, morfològiques i moleculars diferents.

- La *variant endèmica* és freqüent en l'Àfrica equatorial i Papua Nova Guinea. És l'afectació infantil maligna més freqüent.
- La *variant esporàdica* que afecta sobretot nens i adults joves amb un pic d'incidència en adults grans. Representa el 1-2% dels limfomes dels Estats Units i Europa de l'oest.
- El *BL associat a immunodeficiència*, freqüent en context d'infecció pel virus de la immunodeficiència adquirida (VIH).

Etiològicament, l'afectació endèmica es relaciona amb VEB, encara que també s'associa a infecció per *Plasmodium falciparum* i altres patògens, com herpes virus 5 i 8 (Bornkamm, 2009). En la variant esporàdica, es pot detectar VEB fins un 30% dels casos i en els BL associats a immunodeficiència fins a un 40% dels casos.

PRESENTACIÓ CLÍNICA

Els pacients es presenten amb molta càrrega tumoral en forma de grans masses. L'afectació extraganglionar és molt freqüent, entre elles, l'afectació del SNC. En els casos endèmics l'afectació mandibular i dels ossos de la cara és característic. Els esporàdics es presenten, la majoria, com masses abdominals, típicament amb afectació ili-cec. Els casos associats a immunodeficiència, l'afectació ganglionar i de MO és freqüent. Es poden observar fases leucèmiques, encara que aquestes són molt poc freqüents.

ESTUDI MORFOLÒGIC

Des del punt de vista histològic la lesió està formada per cèl·lules B de mida intermèdia, amb un patró de creixement monòton, de citoplasma basòfil amb ocasionals vacuoles lipídiques i nuclis rodons amb cromatina finament granular. És un tumor amb molta proliferació, amb gran quantitat de mitosis i apoptosi. Presenta un patró en "cel estrellat", per la presència de nombrosos macròfags de cos tangible.

PERFIL IMMUNOFENOTÍPIC

Les cèl·lules tumorals expressen marcadors de línia B i de GC així com MYC de forma intensa en la majoria de casos. L'índex de proliferació amb Ki-67 és d'un 100% aproximadament. CD5, CD23, BCL2 i TdT acostumen a ser negatius, encara que es poden veure fenotips aberrants, com pèrdua d'expressió de CD10 i una feble detecció de BCL2 (BCL2^w).

CÈL·LULA D'ORIGEN

Inicialment, d'acord amb els patrons d'hipermutació somàtica i l'expressió de molècules específiques relacionades amb el VEB, alguns autors van suggerir un origen diferent per a les formes endèmiques i esporàdiques (Bellan C, 2005).

Estudis posteriors basant-se en l'expressió de marcadors concrets, com CXCR4 i CD86 per citometria de flux i estudis d'immunofluorescència, i de perfils genètics, el BL es considera una neoplàsia derivada de DZ del GC (Figura 3) (Victoria GD, 2012) (Caron G, 2009) (Dave SS, 2006).

ALTERACIONS CITOGENÈTIQUES DESCRITES

L'alteració citogenètica característica en el BL és la presència de la translocació *MYC*. A diferència del DLBCL, NOS, en què aquesta es dona en context de cariotips complexos, en el BL normalment és un alteració genètica única, si bé s'han descrit alteracions addicionals com guanys de **1q**, i del cromosomes **7** i **12** i pèrdues de **6q**, **13q32-34** i **17p**. En pràcticament tots els casos, els gens amb qui es reordena *MYC* són el gen de les cadenes pesades de les immunoglobulines (*IGH*) (en el 80% dels casos) o de les cadenes lleugeres (*IgL*) (en el 20%) [Kappa (κ) o Lambda (λ)]. En aproximadament, un 10% dels BL no podem detectar reordenament de *MYC* per les tècniques què disposem actualment. En aquests casos s'han de descartar altres processos limfoproliferatius que poden simular un BL. Algun d'aquests podrien correspondre a "**Burkitt-like lymphoma with 11q aberrations**" (BLL-11q), entitat darrerament descrita i inclosa en la classificació de l'WHO.

FACTORS PRONÒSTIC

Com a factors de mal pronòstic s'han descrit l'afectació extensa, de MO o del sistema nerviós central (SNC), nivells alts de LDH sèrica o tumors grans que no es poden extirpar (Swerdlow SH C. E., 2017).

1.5.4 Limfoma B d'alt grau (HGBL)

1.5.4.1 Definició

És un grup de limfomes agressius de cèl·lules B madures que no poder ser classificats com DLBCL, NOS o BL. Es descriuen dues categories: HGBL amb translocacions de *MYC* i *BCL2* i/o *BCL6* (HGBL-DH/TH) i els HGBL, no especificat (HGBL-NOS).

1.5.4.2 HGBL amb translocació de *MYC* i *BCL2* i/o *BCL6* (HGBL-DH/TH)

GENERALITATS

Aquest grup el constitueixen limfomes B de cèl·lules madures amb translocacions de *MYC* i dels gens *BCL2* i/o *BCL6*. Representen, aproximadament, el 10% dels limfomes *de novo* (Barrans 2010) (Foot NJ, 2011). S'anomenen freqüentment com limfomes doble-hit (DH, limfomes amb translocació de *MYC* i *BCL2* o *BCL6*) o triple-hit (TH, limfomes amb translocacions dels 3 gens referenciats). En aquest grup s'inclouen casos DH amb morfologia blàstica i DLBCL, NOS amb translocacions de *MYC* i *BCL2* i/o *BCL6*. Aquesta entitat no inclou, però, altres tipus de limfomes amb altres translocacions associades a *MYC*, com són els FL amb translocacions de *MYC* i *BCL2*, MCL amb translocacions de *MYC* i *ciclina D1*, casos poc freqüents de leucèmies/limfomes B limfoblàstiques ni limfomes amb presència d'augment de nombre de còpies o amplificacions d'aquests gens sense reordenaments. Abans de la classificació actual de la WHO 2016, molts d'ells eren classificats dins d'una categoria introduïda a l'anterior classificació (WHO 2008): "limfoma B no classificable, amb troballes intermèdies entre DLBCL i BL (BCLU)".

PRESENTACIÓ CLÍNICA

Clínicament acostumen a ser pacients entre la sisena-setena dècada de la vida (rang 51-65 anys). Són lleugerament més freqüent en homes. Generalment els pacients es presenten en estadis avançats IPI intermedi-alt (estadis de la classificació d'Ann Arbor III/IV amb presència de múltiples ganglis limfàtics i afectació extraganglionar, LDH sèrica elevada) amb compromís del MO i del SNC (Lindsley RC, 2012). Tot i que la majoria dels HGBCL-DH apareixen *de novo* (85% dels casos), un 15-50% d'aquests són diagnosticats en pacients amb història prèvia de limfoma de baix grau, sobretot FL. En aquests casos es recomana diagnosticar-los com HGBL amb reordenament de *MYC* i *BCL2*, transformat d'un FL (Swerdlow SH C. E., 2017) (Snuderl M, 2010) (Li S, 2011) (Pedersen MO, 2012).

ESTUDI MORFOLÒGIC

Molts d'aquests casos (aproximadament la meitat) presenten una morfologia similar a DLBCL, NOS. L'altre 50% tenen una morfologia similar a un BL o bé troballes intermèdies entre DLBCL, NOS i BL, presentant trets atípics per un BL com un major pleomorfisme (cèl·lules B més grans) o un perfil immunohistoquímic no habitual, com l'expressió moderada-intensa de BCL2 o índex de proliferació (Ki-67) menor al 95%. En un percentatge mínim de casos la morfologia pot ser més blàstica.

PERFIL IMMUNOFENOTÍPIC

Aquests limfomes expressen marcadors de cèl·lules B i la majoria marcadors de GC. Alguns no expressen IG de superfície i aproximadament un 20% dels casos són IRF4/MUM1⁺. BCL2 és intens, a diferència dels BL. L'índex de proliferació és variable així com l'expressió de MYC.

Malgrat que encara està per determinar si la implicació pronòstica de l'assignació a COO en el DLBCL, NOS es pot aplicar en els HGBL-DH/TH, els HGBL-DH *MYC/BCL2* presenten pràcticament tots un immunofenotip GCB (Barrans S, 2010) (Li S L. P., 2012). En canvi, els HGBL-DH *MYC/BCL6* freqüentment són fenotip no-GCB, amb menor expressió de CD10 i de BCL2. Acostumen a tenir una morfologia immunoblàstica, cariotips menys complexes que els HGBL-DH *MYC/BCL2* i més freqüentment tenen afectació extraganglionar. Tot això ha fet que alguns autors els considerin una malaltia biològicament diferent als HGBL-DH *MYC/BCL2* (Pillai RK, 2013) (Rosenthal A, 2017).

CÈL·LULA D'ORIGEN

Els pocs estudis d'expressió gènica i de perfils immunohistoquímics suggereixen que la gran majoria de casos HGBL-DH/TH s'originen d'una cèl·lula B madura GC. En un estudi recent es suggereix que aquests podrien tenir un origen en les cèl·lules B de la zona intermèdia del GC (Ennishi D J. A., 2018). En canvi, la COO dels casos amb translocacions *MYC/BCL6* és més variable (Figura 3) (Copie-Bergman C, 2015).

ALTERACIONS GENÈTIQUES DESCRITES

A part de les translocacions de *MYC* i *BCL2* i/o *BCL6*, altres alteracions genètiques associades poden ser mutacions en **TP53** (Gebauer N B. V., 2015), especialment en casos HGBL-DH *MYC/BCL2* (20-30% dels pacients) i en **MYD88** (Gebauer N B. V., 2015).

FACTORS PRONÒSTIC

Aquest tipus de limfomes són altament resistents a quimioteràpia estàndard amb el que la resposta completa així com la OS amb R-CHOP o tractaments similars és baixa, amb mitjanes de supervivència d'entorn 4.5-18.5 mesos (Le Gouill S, 2007) (Johnson NA S. K., 2009) (Tomita N, 2009) (Snuderl M, 2010) (Barrans S, 2010) (Tomita, 2011) (Li S D. P., 2016) (Li S, 2012). Alguns factors, tant clínics com biològics, que es relacionarien amb aquesta supervivència com el 'partner' en els reordenaments de *MYC* o l'extensió de la malaltia (Pedersen MO, 2014) (Copie-Bergman C, 2015) (Rosenwald A B. S.-B., 2019).

1.5.4.3 HGBL, NO ESPECIFICAT (HGBL-NOS)

GENERALITATS

Aquesta és una categoria heterogènia de limfomes que poden presentar reordenaments de *MYC* sense reordenaments de *BCL2* ni *BCL6* associats i que no pertanyen a la categoria de DLBCL, NOS ni BL, tot i que poden compartir algunes troballes morfològiques, immunofenotípiques i genètiques amb ells. Aquesta categoria també inclouria limfomes de cèl·lules B madures amb morfologia blàstica que no constitueixen la variant blàstica del MCL i que no són classificables en altres categories.

PRESENTACIÓ CLÍNICA

En general es presenta en gent d'edat avançada, amb una incidència que augmenta amb l'edat, afectant de manera equitativa tant dones com homes.

ESTUDI MORFOLÒGIC

La majoria de casos presenten una morfologia similar a un BL, en els que s'identifica una proliferació difusa de cèl·lules de mida intermèdia/gran, de

morfologia variable, amb limfòcits petits acompanyants i un patró de “cel estrellat”. És una lesió agressiva on s’identifiquen nombroses mitosis i apoptosis.

PERFIL IMMUNOFENOTÍPIC

L’immunofenotip no està del tot ben determinat doncs molts d’aquests limfomes estaven inclosos anteriorment en altres categories diagnòstiques, si bé, tots expressen CD20. La majoria són BCL6⁺ però CD10 és variable així com MYC. Per contra, IRF4/MUM1 és negatiu en la majoria de casos. L’índex proliferatiu, valorat amb Ki-67, és variable.

FACTORS PRONÒSTIC

En general tenen mal pronòstic tot i que sembla que podria ser lleugerament millor que els HGBL-DH (Lin P, 2012) (Perry AM C. D., 2013) (Cook JR, 2014).

En resum, en aquest grup de LBCL, partint d’una morfologia, valorada amb les seccions d’hematoxilina-eosina, i mitjançant a estudis complementaris (immunohistoquímica i estudis citogenètics) arribem a una categoria diagnòstica (Figura 7).

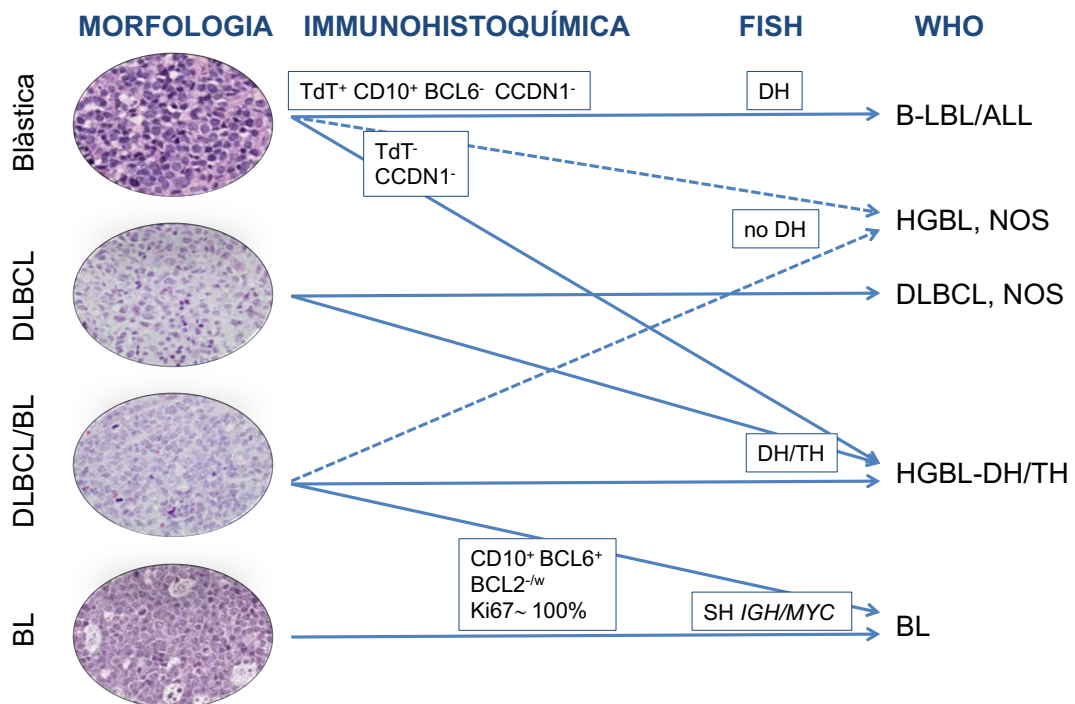


Figura 7. Algoritme diagnòstic en el diagnòstic diferencial dels LBCL. Adaptat del Llibre WHO (Swerdlow SH C. E., 2017).

1.6 MYC (*c-MYC avian myelocytomatosis viral oncogen homolog*)

1.6.1 Introducció

MYC (*c-MYC*; *v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog*) és un dels proto-oncogens més freqüentment implicats en la carcinogènesi i es troba localitzat al cromosoma 8 (8q24). L'evidència directa de què estava relacionat amb el càncer en humans va ser el descobriment i la identificació de *MYC* així com la seva translocació [t(8;14)] en el BL. Posteriorment s'ha demostrat que és un factor de transcripció global essencial que regula un ampli espectre de gens i de processos cel·lulars, controlant gran varietat de funcions cel·lulars: participa en el metabolisme, síntesis proteica, diferenciació i creixement cel·lular i també pot activar la via de *TP53* el que resulta en apoptosi (Fernandez PC, 2003) (Hoffman B, 2008).

1.6.2 *MYC* en el desenvolupament de la cèl·lula B

MYC és essencial pel desenvolupament inicial de les cèl·lules B en el MO donat que activa la transcripció de factors necessaris pel manteniment de la identitat de la cèl·lula B [*early B-cell factor 1 (ebf-1)*].

En els òrgans limfoides secundaris, *MYC* juga un paper decisiu en la formació del fol·licle limfoide. Les cèl·lules B *naïve* no l'expressen, però en estadis inicials de la formació del GC, un petit subgrup d'aquests limfòcits B expressa *MYC*. Aquesta expressió, que sembla ser induïda per la interacció amb antígens i cèl·lules T *helper* fol·liculars (TFH), és essencial per a la formació del GC, encara que és ràpidament reprimida per *BCL6*, iniciant la formació de la DZ del GC i permetent la primera ronda de divisió cel·lular. Els centroblasts de la DZ per tant no expressen *MYC*. Per aquesta proliferació és necessari l'expressió de *TCF3* (E2A) i ciclina D3. *TCF3* també indueix el seu inhibidor, *ID3*. La inhibició de *TCF3* per *ID3* provoca el pas de la cèl·lula B de la DZ a la LZ, on expressarà *IRF4*, mentre que *BCL6* és inhibit. Un petit subgrup de centròcits de la LZ tornaran a expressar *MYC*. Aquesta expressió és necessària per re-entrar a la DZ per seguir adquirint mutacions somàtiques, augmentant la selecció antigènica i proliferar. Els centròcits que no expressen *MYC* poden sortir del GC per a constituir cèl·lules B de memòria o cèl·lules plasmàtiques de vida llarga. La inducció de

BLIMP1 en els plasmoblasts produeix la diferenciació de la cèl·lula plasmàtica i reprimeix MYC (Calado DP, 2012) (Dominguez-Sola D, 2012) (Ott G R. A., 2013). Per tant, una òptima regulació de MYC en les cèl·lules B és primordial per a limitar el nombre de divisions cel·lulars, la correcta migració entre la DZ i LZ, així com la maduració dels limfòcits B (Figura 8).

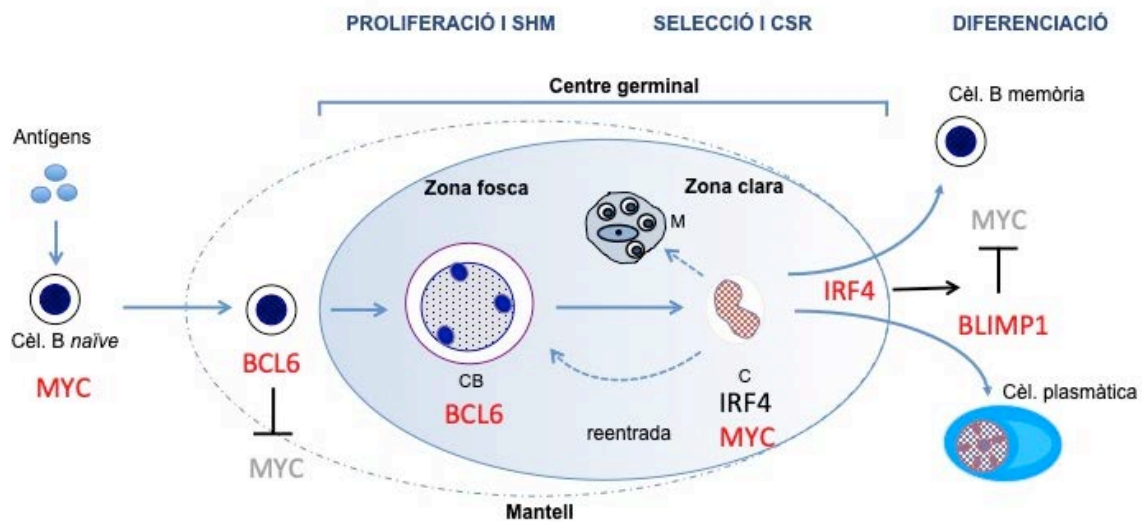


Figura 8. Esquema de l'expressió i regulació de MYC en la formació del GC. Adaptat de Basso *et al.* i Ott *et al.* (Basso K, 2015) (Ott G R. A., 2013). MYC s'expressa inicialment en les cèl·lules B després de la interacció amb els antígens i els limfòcits T (TFH). BCL6 inhibeix MYC i s'inicia la formació de la DZ del GC. Un petit subgrup de cèl·lules de la LZ tornen a expressar MYC el que permet la reentrada a la DZ. Les cèl·lules de LZ que no expressen MYC surten del GC com a cèl·lules de memòria o plasmoblasts. BLIMP1 promou la diferenciació a cèl·lula plasmàtica i inhibeix MYC.

1.6.3 MYC com a factor de transcripció i paper en la tumorigènesi i origen de limfoma

MYC actua en la regulació transcripció de gran varietat de gens però molts estudis han demostrat que també participa en l'allargament de la transcripció (actuant com activador d'un programa de transcripció preexistent) així com a repressor d'aquesta. Per aconseguir la seva funció activadora MYC forma un heterodímer amb la proteïna MAX (*MYC-associated protein X*) i s'uneix a seqüències específiques del DNA, anomenades E-boxes, reclutant proteïnes que remodelen la cromatina. Per a la seva funció repressora de la transcripció, l'heterodímer MYC/MAX interactua amb altres factors de transcripció [com MIZ-1 (*MYC-interacting zinc finger1*)] permetent el reclutament de DNA metil-

transferases (DNMT3A i DNMT3B) que produeixen la metilació del DNA i per tant, suprimir l'expressió gènica.

En condicions normals tant MYC mRNA com la proteïna tenen una vida mitja molt curta (uns 15-20 minuts). L'expressió de MYC està regulada en funció de la resposta a estímuls extracel·lulars i múltiples mecanismes de control genètics i epigenètics (Fernandez PC, 2003) (Thomas LR, 2011). En aquesta situació, sembla que es produeixen polsos transitoris d'expressió de MYC que augmenten les vies de síntesis i metabolisme per assegurar un subministrament adequat de macromolècules a les cèl·lules que proliferen. En canvi, una expressió constitutiva condueix a alts nivells de MYC i porta la cèl·lula a un estat de contínua expressió i repressió de gens afavorint una transformació maligna. Així, entre d'altres mecanismes, MYC:

- promou el cicle cel·lular facilitant la transició de la fase G0/1 a la fase S induint la producció de cinases ciclina-dependents (com la ciclina D2) i el factor de transcripció E2F1 i la inhibició de proteïnes que controlen el cicle cel·lular com p21 o p27.
- afavoreix la fugida del sistema de vigilància immunitari induint la producció de proteïnes relacionades amb el manteniment de la tolerància auto-immune, com PD-L1.
- promou angiogènesi a través de HIF-1 α , VEGF i activant vies de senyalització angiogènica, com NOTCH.
- promou l'apoptosis activant ARF que s'uneix i bloqueja MDM2. Aquest bloqueig evita la degradació de p53. També suprimeix de manera indirecta proteïnes antiapoptòtiques (BCL2 i BCL-X_L).

A més de la seva capacitat de modificar la transcripció de gens, MYC també regula un gran nombre de micro-RNA (mi-RNA) amb funcions oncogèniques o supressores tumorals (Figura 9) (Meyer N, 2008) (Klapproth K, 2010) (Sewastianik T, 2014) (Ott G R. A., 2013) (Filip D, 2020) (Nguyen L, 2017) (Smith SM, 2010) (Cai Q, 2015).

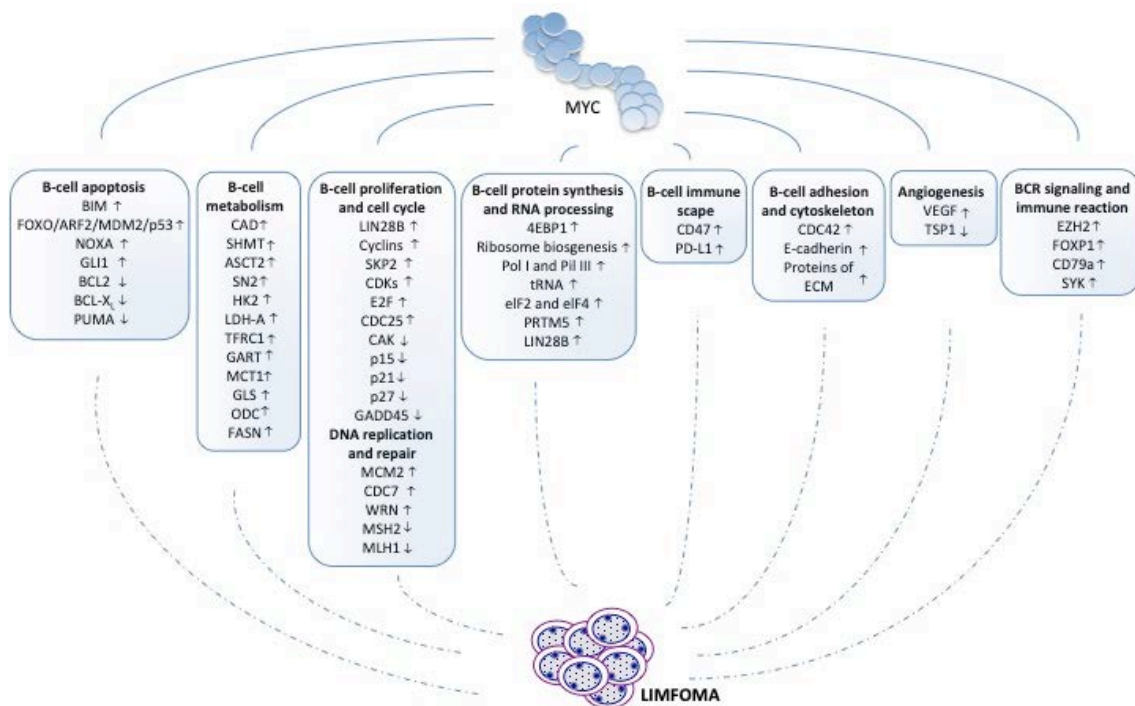


Figura 9. Diances de MYC relacionades amb la transformació dels limfomes i agressivitat. Adaptat de Filip D *et al.* (Filip D, 2020). MYC coordina l'expressió de un ampli espectre de gens relacionats amb limfomes B. La regulació d'aquests gens per part de MYC implica l'augment o la disminució en l'expressió de gens diana.

1.6.4 MYC en els processos limfoproliferatius d'alt grau

La sobreexpressió de MYC per si sola no és un mecanisme suficient per al desenvolupament dels limfomes, però és una alteració que s'identifica de manera freqüent a LBCL, així com en la transformació de limfomes de baix grau a LBCL. En el context de les síndromes limfoproliferatives, aquesta sobreexpressió es troba en el context d'esdeveniments oncogènics que inclouen translocacions, amplificacions, guany de nombre de còpies i mutacions, essent aquestes últimes són més freqüents en els casos amb reordenaments concomitants.

ESTUDI DE LES ALTERACIONS DE MYC

La detecció de translocacions de MYC en les síndromes limfoproliferatives resulta essencial en la pràctica clínica, tant pel diagnòstic com pel pronòstic d'aquestes malalties. Pel seu estudi, el cariotip convencional i les tècniques d'hibridació *in situ* per fluorescència (FISH) són les utilitzades. El primer permet mostrar la complexitat genòmica de les cèl·lules tumorals (alteracions

numèriques i estructurals) i determinar la parella (*'partner'*) en les translocacions de *MYC*. El principal desavantatge és que requereix de teixit fresc amb capacitat de créixer en cultius. Per aquesta raó les tècniques de FISH d'interfase són les més emprades en la pràctica clínica usual, doncs es poden realitzar en teixit fresc o en mostres parafinades. Es poden detectar translocacions de *MYC* tant en probes dual-color break-apart [o sonda *split* (BAP)] com amb les de doble fusió. Amb les primeres no tenim informació sobre el *'partner'* de fusió, però són més fàcils d'interpretar i tenen major especificitat que les sondes de fusió. Per a identificar els *'partners'* de fusió s'utilitzen les sondes de doble fusió *IGH/MYC* o *IGLambda/MYC* o *IGKappa/MYC*. Aquesta aproximació no permet detectar, però, els reordenaments amb altres gens no relacionats amb les IG i calen estudis més complexos no incorporats de manera rutinària en la pràctica clínica, encara. Amb les tècniques de FISH també podem detectar amplificacions del gen (>4 còpies del gen) i els guanys (presència de 3-4 còpies del gen), que han mostrat tenir impacte pronòstic en aquestes malalties (Valera A, 2013) (Figura 10).

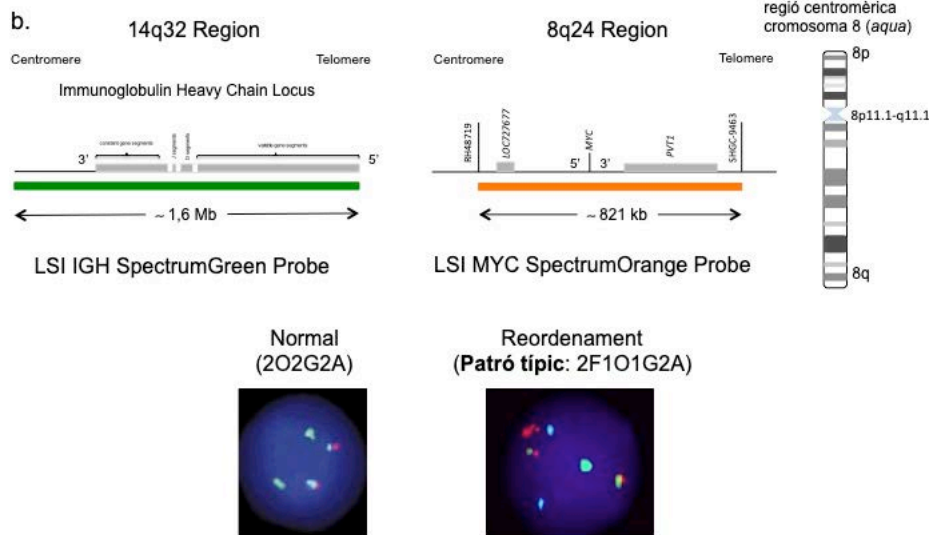
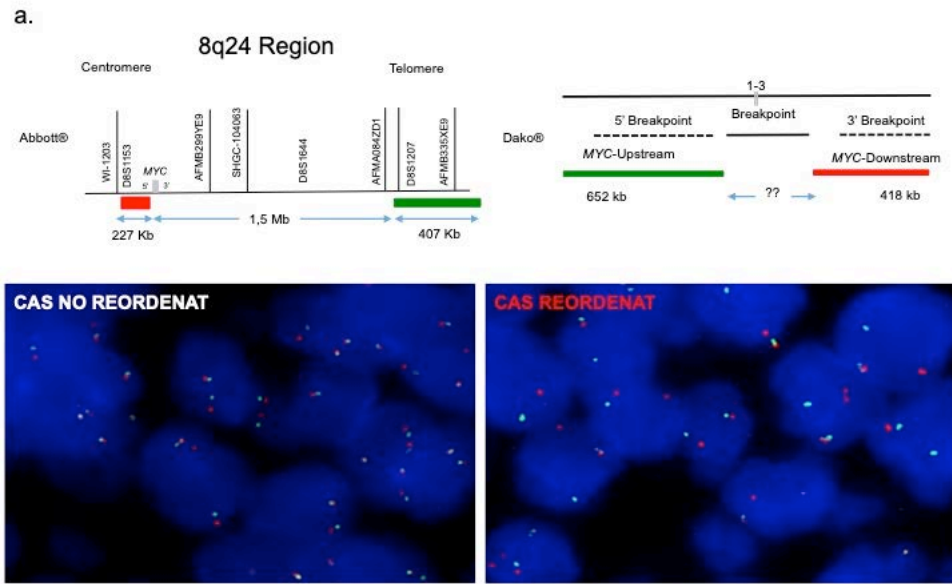


Figura 10. Sondes de FISH per l'estudi de reordenaments de *MYC*. a. Imatge superior. Esquema de les sondes dual-break apart utilitzades comunament. Les senyals vermelles i verdes marquen dues regions del gen *MYC*. Imatge inferior: cas no reordenat: s'observen dues senyals (una verda i una vermella) juntes. En cas de reordenament, les senyals verdes i vermelles es separen, indicant ruptura del gen. b. Imatge inferior. Esquema de la sonda *dual-color fusion IGH/MYC*. La sonda verd marca el gen de les cadenes pesades de les immunoglobulines (*IGH*), la sonda vermella el gen *MYC* i en blau es marca el centròmer del cromosoma 8. Imatge inferior: cas no reordenat: s'identifiquen dos senyals verdes, dues vermelles i dues blaves. En cas de reordenament s'identifiquen dos senyals de fusió (groc), una verda, una vermella i dues aqua.

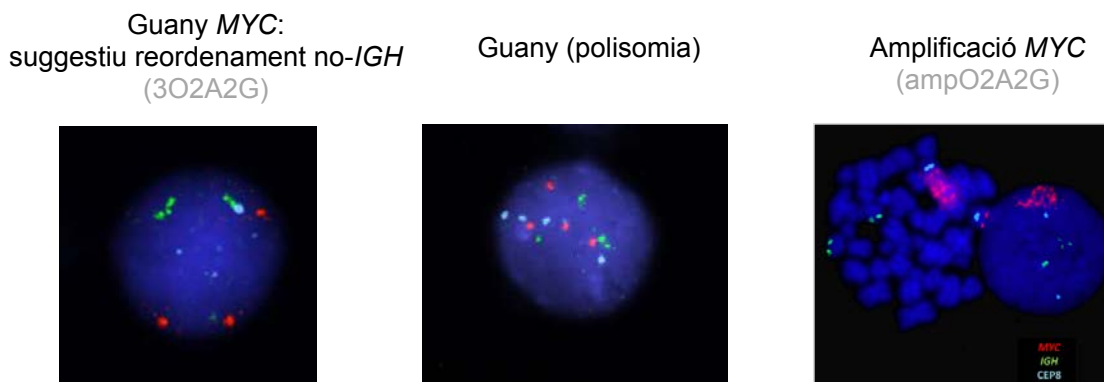


Figura 11. Sondes de FISH per l'estudi d'altres alteracions del gen *MYC*. En la primera imatge, amb sonda *dual-color fusion IGH/MYC* s'identifiquen dues senyals verdes (*IGH*), dues *aqua* (centròmer cromosoma 8) i tres vermelles (*MYC*) que suggereixen el reordenament de *MYC* amb un gen no-*IGH*. També podem identificar guanys del gen (3-4 còpies) i amplificacions (>4 còpies) (imatge central i esquerra).

1.6.5 Alteracions citogenètiques de *MYC* en els limfomes B d'alt grau.

- EN ELS DLBCL, NOS.

Les **translocacions** del gen *MYC* tenen una prevalença d'un 5-15% dels casos en les diferents sèries publicades. Freqüentment, el gen implicat en aquestes translocacions són les cadenes pesades de les IGs (*IGH*), el que resulta en una activació constitutiva de la transcripció produint els nivells més alts de *MYC* mRNA i de la proteïna. Entre els DLBCL, NOS, es presenta amb més freqüència en els que tenen un fenotip GCB (70% dels casos) (Savage KJ, 2009) (Niitsu N, 2009) (Johnson NA S. K., 2009) (Barrans S, 2010) (Valera A, 2013) (Pedersen MO, 2014).

En els DLBCL, NOS, al contrari que en el BL, en un 35-50% dels casos *MYC* pot translocar-se amb altres gens no-IGs com *PAX5*, *BCL6*, *BCL11A*, *IKZF1* (*IKAROS*) i *BTG1*. En aquests casos els mecanismes d'alteració de la regulació de *MYC* no estan tant clars però, el que sí s'ha demostrat és que la quantitat de *MYC* mRNA i de proteïna detectada és menor (Bertrand P, 2007) (Copie-Bergman C, 2015).

Diversos estudis realitzats en DLBCL, NOS han demostrat que la presència de translocacions d'aquest gen, estudiats mitjançant FISH, és un factor de mal

pronòstic (pitjor PFS i OS) en pacients tractats amb R-CHOP, pronòstic fins i tot, semblant als HGBL-DH *MYC/BCL2* (Barrans S, 2010) (Copie-Bergman C, 2015) (Green TM Y. K., 2012) (Savage KJ, 2009) (Tzankov A, 2014) (Valera A, 2013). A més, diversos autors han descrit que el '*partner*' de translocació de *MYC* també és de gran importància clínica, doncs, alguns estudis han demostrat que la presència de reordenament *IG/MYC* és un factor pronòstic negatiu, presentant els pacients una menor OS (Copie-Bergman C, 2015) (Rosenwald A B. S.-B., 2019).

Pel que fa a les **mutacions**, la prevalença d'aquesta també varia segons el tipus de síndrome limfoproliferativa trobant-se en el 5%-33% del DLBCL, NOS. *MYC* pot adquirir-les en context d'hipermutació somàtica i es pot presentar en presència o no de translocacions (Johnson NA., 2016) (Xu-Monette ZY, 2016).

Finalment, els **guanys** i les **amplificacions** s'han identificat en un 19-38% i 2% dels DLBCL, NOS respectivament. S'han publicat múltiples estudis sobre la seva relació amb l'expressió proteica i el seu impacte clínic amb resultats discordants, tot i que la idea és que sí s'associen a pronòstic més desfavorable (Stasik CJ, 2010) (Testoni M K. I., 2011) (Valera A, 2013) (Lu TX, 2015) (Landsburg DJ, 2016).

- EN ELS BL

La translocació del gen *MYC* està present en pràcticament el 90% del BL i, en la gran majoria de vegades, el gen implicat és *IGH*. En un 20% dels casos *MYC* es reordena amb el *IGL* [κ (*IGK*) o λ (*IGL*)]. De manera característica, aquests reordenaments es donen en context de cariotips simples, constituent moltes vegades l'única alteració genètica. En un 10% de casos, no es detecten reordenaments, amb el què s'ha proposat altres mecanismes que actuarien alterant la regulació de *MYC* (Leucci E, 2008).

Les **mutacions** poden detectar-se en 50-70% dels casos, sobretot en la variant endèmica. El patró de mutació és diferent al que presenten els DLBCL, NOS. Algunes variants d'aquestes mutacions, com són la *T58* o *F138*, molt freqüents

en els BL són, en canvi, rares en els DLBCL, NOS (es presenten en <1% dels casos) (Xu-Monette ZY, 2016).

- EN ELS HGBL-DH/TH

Aquest tipus de limfoma presenten dues o més alteracions citogenètiques, una d'elles, per definició, la translocació de *MYC*. En la majoria de casos tenen alteracions addicionals (cariotips complexes). La combinació *MYC* i *BCL2* és la més freqüent (60-65% són HGBL-DH *MYC/BCL2*), un 20% són HGBL-TH i el 14-20% són HGBL-DH *MYC/BCL6* i (Tomita N, 2009) (Miyaoaka M K. Y., 2017) (Sesques P, 2017).

Prèviament s'ha comentat que la majoria dels DH-HGBL *MYC/BCL2* apareixen en pacients de *novo*, mentre que un percentatge menor es presenten com a transformació d'un FL. En aquests casos sembla raonable pensar que el reordenament de *MYC* és un esdeveniment secundari a diferència del BL, on la translocació *IG/MYC* és un esdeveniment primari (Martin-Subero JI, 2005) (Hwang YY, 2011) (Kobayashi H, 2011) (Gauwerky CE, 1988) (De Jong D, 1988).

En aquest grup de limfomes, a més de les translocacions de *MYC*, també podem trobar casos amb **amplificacions** del gen *MYC* conjuntament amb reordenaments d'aquest gen i de *BCL2* i /o *BCL6*. Aquests casos tenen un impacte clínic similar als DH clàssics.

- EN ELS HGBL, NOS

En els HGBL, NOS, per definició, els reordenaments de *BCL2* i/o *BCL6* en combinació amb el de *MYC* han de ser exclosos. Les **translocacions** de *MYC* són presents en un 20-35% dels casos. Aquesta alteració citogenètica es pot presentar conjuntament amb augment de nombre de còpies o amplificacions de *BCL2*. També s'han descrit reordenaments de *BCL2* que s'associen a augment de **nombre de còpies o amplificacions** de *MYC* (Perry AM C. D., 2013) (Lin P, 2012) (Li S S. A., 2015).

1.7 LMO2 (Hematopoietic transcription factor LIM domain only protein 2)

1.7.1 Introducció

Hematopoietic transcription factor LIM domain only protein 2 (LMO2), també conegut com *TTG2* o *RBTN2*, descrit per primera vegada com a oncogen de les cèl·lules T, va ser descobert i clonat a partir de sang perifèrica d'un pacient amb leucèmia limfoblàstica aguda T (T-ALL) (Boehm T, 1991) (Royer-Pokora B, 1991). És un gen que es localitza al braç curt del cromosoma 11 (11p13). Codifica un factor de transcripció de 156 amino-àcids i conté dos dominis LIM zinc-fingers. La seva expressió és necessària per l'hematopoesi així com l'angiogènesi (Figura 12) i participa en l'expressió de gens a través de interaccions proteïna-proteïna amb altres factors de transcripció, formant complexos proteics grans (Yamada Y W. A., 1998) (Warren AJ, 1994) (Chambers J, 2015) (Yamada Y P. R., 2000).

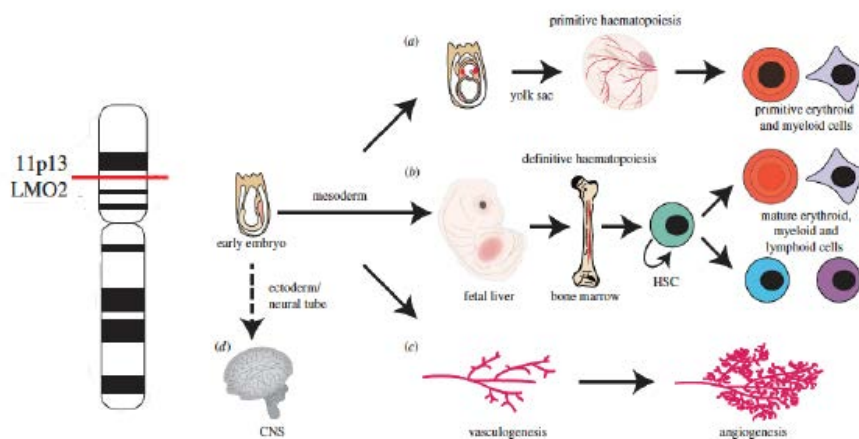


Figura 12. Localització del gen *LMO2* i funcions. Paper de *LMO2* en el desenvolupament murí. *LMO2* és un gen que es localitza a al cromosoma 11 (11p13). *LMO2* és necessari per la hematopoesi, pel remodelat de la xarxa vascular com a part de l'angiogènesi, s'ha demostrat la seva expressió en el desenvolupament del SNC. Adaptat de Chambers *et al.* (Chambers J, 2015).

Estan descrits diferents tipus de complexos depenent del tipus cel·lular. En les cèl·lules endotelials i en les cèl·lules mare del sistema hematopoètic *LMO2* interacciona amb *LDB1*, *SCL/TAL1*, *E2A* i *GATA2*, i en les cèl·lules eritroides ho fa amb *TAL-1*, *GATA 1* i *LDB1* (Kadmas JL, 2004) (Osada H, 1995) (Wadman IA, 1997) (Valge-Archer V, 1998) (El Omari K, 2011).

Cubedo *et al.* van demostrar la formació d'un complex específic de LMO2 en **línies cel·lulars de DLBCL** diferent al descrit en les cèl·lules T, els endotelis o en les cèl·lules eritroides, de manera que LMO2 interaccionaria amb altres proteïnes (com HEB, Lyl1, ETO2, ELK1, NFATc1 i LEF1) afavorint l'expressió de determinats gens diana (Figura 13). Algun d'aquests gens estan relacionats amb el cicle cel·lular i amb les estructures del cromosoma, nucleosoma i cinetocor. No van poder demostrar, però, que la sobreexpressió LMO2 es relacionés amb la proliferació cel·lular però sí que la seva expressió conduïa a aberracions numèriques del centrosoma així com irregularitats estructurals. Aquestes alteracions en el centrosoma podrien contribuir al desenvolupament del càncer i el seu paper en la patogènesi del DLBCL (Cubedo E, 2012) (Nigg EA, 2002).

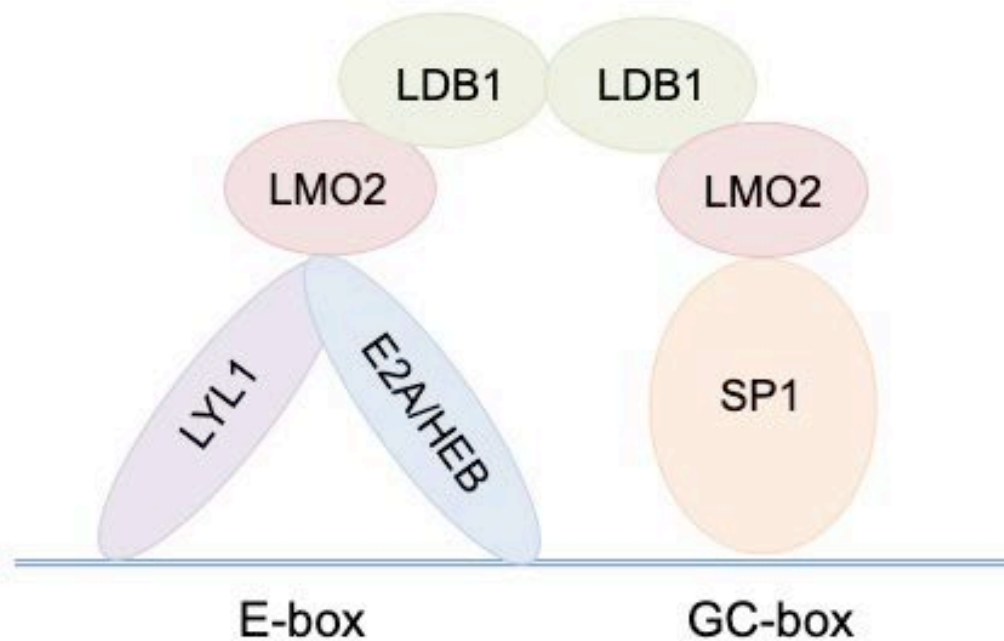


Figura 13. Representació esquemàtica del complex proteic LMO2 en les cèl·lules de línia cel·lular de DLBCL. Adaptat de Cubedo *et al.* (Cubedo E, 2012).

En un estudi recent, Parvin *et al.* han demostrat que les cèl·lules de línies tumorals de DLBCL amb sobreexpressió de LMO2 (DLBCL^{LMO2+}) tenen compromesos els mecanismes de reparació del DNA, demostrant el paper de LMO2 en la inestabilitat genòmica (Parvin S, 2019).

Els mecanismes de la seva sobreexpressió, en alguns casos, encara són desconeguts. En les T-ALL s'ha observat que aquesta expressió aberrant pot explicar-se per la presència translocacions cromosòmiques [t(11;14)(p13;q11) o t(7;11)(q35;p13)] o respondre a delecions críptiques en el domini regulador negatiu de *LMO2* [del(11)(p12p13)]. Malgrat això, es pot detectar sobreexpressió en pacients sense la presència d'alteracions citogenètiques que afectin aquest gen, fet que suggereix la possible presència de reordenaments críptics (Hammond SM, 2005) (Wu L, 2015).

1.7.2 Estudis d'expressió i paper pronòstic del gen *LMO2*

La publicació de l'estudi d'Alizadeh *et al.* va mostrar que *LMO2* és un dels gens més rellevants que defineixen el perfil gènic GCB-DLBCL i va conduir al desenvolupament de diferents models predictors de supervivència en pacients amb DLBCL, NOS basats en RNA i l'expressió proteica de diferents gens (Alizadeh AA E. M., 2000) (Rosenwald A W. G., 2002) (Shipp MA R. K., 2002) (Wright G, 2003). Un d'aquests estudis va dissenyar un model que permetia predir OS mitjançant 6 gens i van demostrar que l'expressió de *LMO2* es correlacionava amb una major supervivència, independentment de l'IPI, en pacients amb DLBCL, NOS tractats amb antraciclins (Lossos IS C. D., 2004). Estudis posteriors van confirmar aquests resultats, tant en pacients tractats amb quimioteràpia basada en antraciclins amb o sense rituximab (R-CHOP/CHOP) (Malumbres R, 2008) (Alizadeh AA G. A., 2011). Aquesta capacitat pronòstica probablement es deu en part perquè identifica casos classificats de manera gènica i immunofenotípica com GCB-DLBCL.

1.7.3 Expressió immunohistoquímica de *LMO2* en les cèl·lules B

El grup de la universitat de Stanford va clonar *LMO2* el 2007 i va obtenir una proteïna detectable en teixits fixats en formol i inclosos en parafina, el que ha permès estudiar l'expressió immunohistoquímica de *LMO2*. Per aquest estudi es va desenvolupat un anticòs primari monoclonal de ratolí anti-*LMO2* (***LMO2* clon 1A9-1**), que és una IgG1 monoclonal que conté una cadena lleugera kappa

(dilució 1:150, DAKO® Envision method). La tinció es va optimitzar en seccions d'amígdala i es va valorar la tinció en teixit hemato-limfoide no neoplàsic i neoplàsic així com en línies cel·lulars de DLBCL, BL i no hemato-limfoides. Es va assignar com a 'valor positiu' un llindar de tinció en >30% de les cèl·lules limfoides tumorals (Natkunam Y Z. S., 2007). Posteriorment es va descriure un nou clon, un anticòs primari monoclonal de conill anti-LMO2 (**LMO2 clon SP51**) amb resultats d'expressió similars (Agostinelli C, 2012), tot i que els autors van observar expressió en cèl·lules del mantell tant en ganglis limfàtics com en amígdala no tumorals, no identificada amb el clon 1A9-1. S'han publicat altres articles estudiant l'expressió de LMO2 en teixits no tumorals i en neoplàsies limfoides amb resultats semblants (Shams, 2011) (Younes SF B. A., 2011) (Menter T, 2015).

EXPRESSIÓ EN ÒRGANS HEMATOLIMFOIDES NO TUMORALS

En teixit limfoide normal, LMO2 té una expressió nuclear i intensa en els limfòcits CD20⁺ del GC, observant-se escasses cèl·lules positives en el mantell. Es poden també veure escasses cèl·lules que expressen LMO2 en àrees interfol·liculars, que es poden detectar també amb CD30, indicant que aquestes cèl·lules probablement corresponen a limfòcits B o T activats (Natkunam Y Z. S., 2007).

En el timus, LMO2 s'expressa en escassos limfòcits, la majoria localitzats a la medul·la. A la melsa s'observa tinció en el GC, mentre que en el mantell i en la zona marginal no s'observa. En el MO, LMO2 s'expressa durant la limfopoesi inicial de les cèl·lules B. A més, es detecta expressió en les tres línies hematopoètiques, però no en les cèl·lules mieloides madures.

EXPRESSIÓ EN NEOPLÀSIES HEMATOLÒGIQUES

Diversos estudis van demostrar expressió de LMO2 $\geq 50\%$ de les cèl·lules tumorals en els FL (independentment del grau histològic), en limfomes de Hodgkin variant predominant limfocítica nodular i en limfoma de cèl·lules B grans primari mediastínic. En els DLBCL, NOS s'observa tinció també en $\geq 50\%$ dels casos i aquesta sembla estar relacionada amb el perfil de la COO. Natkunam *et al.* van demostrar expressió en 45/62 GCB-DLBCL i en 30/66 no-GCB-DLBCL, utilitzant l'algoritme de Hans per classificar aquestes neoplàsies. Agostinelli *et*

al., utilitzant el clon SP51, demostren expressió en 87-90% dels GCB-DLBCL, independentment de l'algoritme utilitzat (Hans, Choi o Tally) i en >50% dels no-GCB-DLBCL. En el BL es va detectar expressió en menys del 50% dels casos i, entre les neoplàsies limfoides de cèl·lules precursors, és present en els limfomes/leucèmies limfoblàstiques agudes B i T (Younes SF B. A., 2010) (Shams, 2011) (Younes SF B. A., 2011). En leucèmia limfoblàstica T, l'absència d'expressió de LMO2 s'ha associat a un comportament indolent de la malaltia (Brar N, LIM domain only 2 (LMO2) expression distinguishes T- lymphoblastic leukemia/lymphoma from indolent T-lymphoblastic proliferations., 2020) (Brar N, LIM domain only 2 (LMO2) expression distinguishes T-lymphoblastic leukemia/lymphoma from indolent T-lymphoblastic proliferations., 2020). En leucèmia mieloide aguda també s'ha identificat expressió de LMO2 fins en un 40%, associant-se a casos amb cariotips no alterats (Patel JL, 2014).

L'expressió de LMO2 és absent en limfomes de la zona marginal (MZL), CLL, limfomes limfoplasmacítics (LPL), limfomes T perifèrics i en la majoria de MCL i limfomes de Hodgkin variant clàssica. Alguns autors proposen que la detecció immunohistoquímica de LMO2 podria tenir un valor pràctic pel diagnòstic de neoplàsies de cèl·lules B petites i per a distingir limfoproliferatius B de baix grau (MZL i LPL) de FL, i per tan útil en detectar FL CD10 negatiu i/o BCL2 negatiu (Younes SF B. A., 2011) (Menter T, 2015) (Dyhalo KS, 2013).

1.7.4 Paper pronòstic de l'expressió immunohistoquímica de LMO2 en limfomes B agressius

Els estudis publicats es centren en el DLBCL, NOS. L'expressió de LMO2 es detecta en un 50% dels DLBCL aproximadament i es correlaciona amb els patrons d'expressió de marcadors específics de GC (HGAL, BCL6, CD10) i no amb marcadors no-GC (MUM-1/IRF4 o BCL2), reflectint, en part, la COO. Tot i això, aquesta es pot detectar de manera molt variable, fins aproximadament, el 50% dels no-GCB-DLBCL (Natkunam Y Z. S., 2007) (Shams, 2011) (Gutierrez-Garcia G, 2011) (Agostinelli C, 2012).

Tal i com es va demostrar en els estudis d'expressió de mRNA, l'expressió immunohistoquímica de LMO2 també té significat pronòstic en els DLBCL, NOS. En l'estudi de Natkunam *et al.* de l'any 2008, que incloïa 263 DLBCL de pacients tractats amb CHOP i 80 tractats amb R-CHOP, l'expressió proteica de LMO2 va ser un factor pronòstic sobre la PFS i OS de manera independent tant del tractament amb rituximab com de l'IPI. Aquesta capacitat predictora de supervivència també es va poder demostrar en pacients amb limfomes primaris B de SNC (Natkunam Y F. P., 2008) (Lossos C, 2014).

No s'ha pogut demostrar, però, que la sobreexpressió proteica de LMO2 en els limfomes d'alt grau respongui a alteracions citogenètiques adquirides. Fins ara només hi ha un estudi publicat en aquest sentit (Durnick DK, 2010). Per tant, la seva expressió, com s'ha comentat anteriorment, podria ser el reflex de la COO (GCB), estar relacionada amb una funció específica de LMO2 o deure's a alteracions citogenètiques críptiques.

2. Justificació de la tesi

Com s'ha comentat anteriorment, la presència de translocacions del gen *MYC* confereix un pitjor pronòstic en els pacients amb DLBCL, NOS fent que el seu estudi sigui important. Aquest requereix de realització de tècniques addicionals, essent les més utilitzades, la citogenètica convencional i els estudis mitjançant FISH. Aquestes proves són laborioses, econòmicament costoses i no estan disponibles en tots els laboratoris. A més, la baixa incidència de translocacions d'aquest gen en el DLBCL, NOS ha afavorit el desenvolupament d'altres estratègies per intentar predir la presència d'aquestes alteracions genètiques, com la determinació immunohistoquímica de *MYC*. Malgrat que el valor de positivitat no ha estat estandarditzat, en la majoria de publicacions s'ha utilitzat com a 'valor positiu' aquell definit com expressió en $\geq 40\%$ de les cèl·lules tumorals (Johnson NA S. G., 2012) (Green TM Y. K., 2012) (Horn H Z. M., 2013). Diferents autors han estudiat l'expressió immunohistoquímica de *MYC*, el seu llindar de positivitat i seva correlació (sensibilitat/especificitat) amb les alteracions genètiques. La majoria conclouen que l'expressió proteica es relaciona amb la presència d'alteracions citogenètiques però discrepen en quin seria el nivell òptim d'aquesta que detectés la gran majoria de DLBCL, NOS amb translocacions del gen. Uns autors recomanen els estudis citogenètics en tumors amb una expressió de *MYC* $\geq 30\%$ mentre que per d'altres seria $\geq 70\%$ (Green TM N. O.-M., 2012) (Agarwal R, 2016) (Tapia G, 2011) (Kluk MJ, 2016) (Chisholm KM, 2015). Al 2015, Wang *et al.*, analitzen en una sèrie de DLBCL, NOS la correlació entre expressió de *MYC* i *BCL2* i la presència de reordenaments dels gens. Els autors demostren que el llindar de positivitat de *MYC* comunament utilitzat ($\geq 40\%$) té una sensibilitat del 81% i una especificitat del 61% de detecció de reordenaments d'aquest gen i també conclouen que l'expressió proteica estaria relacionada amb l'estat del gen (Wang XJ, 2015). A pesar de tot, s'ha de tenir en compte que entre un 28-41% dels DLBCL tenen una expressió de *MYC* alta sense alteracions citogenètiques detectables d'aquest gen (Valera A, 2013) (Stasik CJ, 2010) (Johnson NA S. G., 2012) (Horn H Z. M., 2013). I també al contrari, entre un 10-26% de casos amb presència de translocacions tenen una baixa expressió de *MYC* ($< 40\%$ de cèl·lules positives) (Kluk MJ, 2016) (Raess PW, 2018). Aquesta variabilitat entre l'expressió proteica i la presència de alteracions gèniques dificulta la recomanació de l'ús de l'estudi

immunohistoquímic com a mètode de cribratge únic per a la detecció de translocacions del gen.

L'any 2006 es van publicar simultàniament a *New England Journal of Medicine* el resultat de dos estudis realitzats en limfomes B agressius, un del grup alemany (Molecular Mechanisms in Malignant Lymphomas Network Project of the Deutsche Krebshilfe) i l'altre del consorci internacional del LLMP (Lymphoma/Leukemia Molecular Profiling Project). Aquests estudis van definir el perfil molecular del BL (mBL) mitjançant estudis GEP i també van estudiar la complexitat genètica de BL, DLBCL, de casos definits com *Burkitt-like*/atípic i casos definits com HGBL (Hummel M, 2006) (Dave SS, 2006). La conclusió conjunta d'aquests treballs, al marge de descriure el perfil mBL i diferenciar-lo del perfil de DLBCL, és que havia un grup amb característiques intermèdies entre les dues categories que majoritàriament corresponia als casos definits com *BL-like*/atípic i HGBL, però que també incloïa casos amb morfologia de DLBCL (un petit subgrup de casos que van definir-se en el treball de LLMP com "dissociats"). Tots aquests casos tenien **cariotips complexos i una major incidència de reordenaments de MYC** amb presència de translocacions de *MYC* i de *BCL2* i/o de *BCL6* que el grup amb perfil d'expressió gènica "non-BL". En canvi, els casos amb perfil mBL tenien **cariotips simples** [anomenats *MYC-simple*: presència de fusions *IG/MYC* i una puntuació baixa d'alteracions cromosòmiques, sense translocacions de *BCL2* i/o *BCL6*]. El **perfil molecular específic** (mBL) incloïa una alta expressió de gens diana de *c-MYC* així com gens de cèl·lules B del GC. Una observació nostra, que va iniciar el primer treball de la tesi, va ser veure la baixa expressió de *LMO2* en el BL. Aquest gen, que normalment s'expressa en les cèl·lules de GC i, per tant, en els limfomes d'origen centre-fol·licular, disminuïa la seva expressió a BL.

2.1 Hipòtesi de treball

La tesi actual sorgeix de l'observació d'aquests resultats. La hipòtesi que ens vam plantejar va ser si a BL i a la resta de limfomes B agressius es produïa una disminució de la expressió de *LMO2* tant a nivell de mRNA com de la proteïna,

associada a la presència de reordenament de *MYC*. La hipòtesi del nostre estudi, doncs, és demostrar si la pèrdua d'expressió de LMO2 en limfomes d'alt grau prediu la presència de translocacions de *MYC* i es pot detectar de manera útil a nivell de la pràctica clínica mitjançant la tècnica d'immunohistoquímica. En el grup de LBCL, les translocacions de *MYC* són definitòries d'algunes entitats i també s'associen a un comportament biològic agressiu de les malalties. Aquesta alteració genètica és poc freqüent i la seva prevalença es baixa en diferents estudis (5-15%), mentre que la incidència real no està ben definida. Per això LMO2 ens va semblar una gen interessant a explorar.

2.2 Objectius del treball

Objectiu principal del treball:

1. Identificar si la presència de translocacions de *MYC* en LBCL s'associa a la pèrdua d'expressió gènica i proteica de LMO2.

En cas afirmatiu, avaluar si aquesta associació es pot detectar immunohistoquímicament.

Objectius secundaris:

1. Avaluar les associacions entre *MYC*, LMO2 i perfils immunohistoquímics en LBCL i estudiar la utilitat de LMO2 en relació a *MYC* a nivell immunohistoquímic com predictor de la presència dels reordenaments de *MYC*.
2. Avaluar la utilitat de l'estudi immunohistoquímic de dos clons diferents disponibles en el mercat de LMO2 (1A9-1 i SP51); comparar-los entre ells i amb *MYC*.
3. Avaluar si l'expressió immunohistoquímica de LMO2 (d'ambdós clons immunohistoquímics) aporta informació pronòstica en els LBCL, i comparar-la amb variables útils prèviament descrites.
4. Avaluar si l'absència d'expressió immunohistoquímica de LMO2 és útil pel diagnòstic diferencial entre els BL i altres LBCL.
5. Avaluar si l'estudi de LMO2 i *MYC* a nivell de RNAm té interès clínic.

3. Treballs relacionats

3.1 Primer treball:

LMO2-negative expression predicts the presence of *MYC* translocations in aggressive B-cell lymphomas

Luis Colomo, Ivonne Vazquez, Natalia Papaleo, Blanca Espinet, Anna Ferrer, Catalina Franco, Laura Comerma, Silvia Hernandez, Xavier Calvo, Antonio Salar, Fina Climent, Jose Luis Mate, Pilar Forcada, Lara Nonell, Antonio Martinez, Anna Carrio, Dolors Costa, Ivan Dlouhy, Itziar Salaverria, Jose Ignacio Martin-Subero, Armando Lopez-Guillermo, Alexandra Valera, Elías Campo; Grup per l'Estudi dels Limfomes de Catalunya i Balears (GELCAB).

Am J Surg Pathol 2017; 41(7): 877-886

DOI: 10.1097/pas.0000000000000839

RESUM

La presència de translocacions del gen *MYC*, alteració distintiva del BL i dels HGBL-DH/TH, es pot trobar en fins un 15% dels casos de DLBCL, presentant aquests un pitjor pronòstic, fet que fa el seu estudi sigui d'especial rellevància. Aquest primer estudi sorgeix de l'observació de què en els BL, l'expressió de LMO2 està disminuïda, al contrari que altres marcadors de GC com CD10 i BCL6. La nostra hipòtesi és que l'absència d'expressió de LMO2 en limfomes amb perfil GCB podria constituir un marcador indicador de la presència de translocacions del gen *MYC* (*MYC-R*).

Per això es van estudiar 330 pacients [46 BL, 284 LBCL (268 DLBCL, 16 HGBL-DH/TH)]. L'estudi immunohistoquímic es va realitzar en la secció de teixit complet (WTS) i/o tissue microarrays (TMA). L'estudi de FISH per l'estudi de *MYC* va incloure dues sondes BAP diferents [de Vysis (Abbott® Molecular) i Dako® (Denmark)] i una sonda *dual fusion* específica per *IGH/MYC/CEP8* de Vysis (Abbott® Molecular). Es van utilitzar sondes BAP per l'estudi de *BCL6* i *BCL2* així com sondes *dual fusion* per *IGH/BCL2*.

Es va analitzar l'expressió de la proteïna LMO2 (clon 1A9-1, Ventana, Roche®, Tucson, Arizona) i la presència de *MYC-R*.

LMO2 s'expressava (LMO2⁺) en 1/46 (2%) de BL, 146/268 (54,5%) casos de DLBCL i en 2/16 (12,5%) de HGBL-DH/TH. Tots els BL presentaven *MYC-R* ($P < 0,001$). En tota la sèrie (284 casos amb dades de LMO2 i *MYC*), els casos

LMO2-negatius (LMO2⁻) van ser 136. El 86% dels casos (36/42) amb translocacions de *MYC* van resultar LMO2⁻. LMO2 només va ser positiu en 6/42 (14%) LBCL amb *MYC*-R ($P < 0,001$). Es va realitzar una subanàlisi de la relació entre LMO2⁻ i *MYC*-R i l'expressió de CD10. S'observava una sensibilitat similar tant en el grup CD10⁺ com CD10⁻ (87% vs. 83%) però una major especificitat, PPV, precisió i raó de versemblança (LR) positiu més alt en els casos amb un perfil CD10⁺/LMO2⁻. Si es comparava l'expressió de proteïna LMO2 i *MYC*, totes les mesures estadístiques de rendiment de LMO2 van superar *MYC* en LBCL CD10⁺.

Aquests resultats suggereixen que la pèrdua de LMO2 pot ser un bon predictor de la presència de *MYC*-R en LBCL CD10⁺.

LMO2-negative Expression Predicts the Presence of *MYC* Translocations in Aggressive B-Cell Lymphomas

Luis Colomo, MD,*† Iyonne Vazquez, MD,* Natalia Papaleo, MD,* Blanca Espinet, MD,* Anna Ferrer, MD,* Catalina Franco, MD,* Laura Comerma, MD,* Silvia Hernandez, MD,* Xavier Calvo, MD,* Antonio Salar, MD,* Fina Climent, MD,‡ José Luis Mate, MD,§ Pilar Forcada, MD,|| Anna Mozos, MD,¶ Lara Nonell, MD,# Antonio Martinez, MD,† Anna Carrio, MD,† Dolores Costa, MD,† Ivan Dlouhy, MD,† Itziar Salaverria, MD,† Jose Ignacio Martin-Subero, MD,† Armando Lopez-Guillermo, MD,† Alexandra Valera, MD,†** Elias Campo, MD,† and Grup per l'Estudi dels Limfomes de Catalunya i Balears (GELCAB)

Abstract: *MYC* translocation is a defining feature of Burkitt lymphoma (BL), and the new category of high-grade B-cell lymphomas with *MYC* and *BCL2* and/or *BCL6* translocations, and occurs in 6% to 15% of diffuse large B-cell lymphomas (DLBCLs). The low incidence of *MYC* translocations in DLBCL makes the genetic study of all these lymphomas cumbersome. Strategies based on an initial immunophenotypic screening to select cases with a high probability of carrying the translocation may be useful. LMO2 is a germinal center marker expressed in most lymphomas originated in these cells. Mining gene expression profiling studies, we observed LMO2 down-regulation in BL and large B-cell lymphoma (LBCL) with *MYC* translocations, and postulated that LMO2 protein expression could assist to identify such cases. We analyzed LMO2 protein expression in 46 BLs and 284 LBCL. LMO2 was expressed in 1/46 (2%) BL cases, 146/268 (54.5%) DLBCL cases, and 2/16

(12.5%) high-grade B-cell lymphoma cases with *MYC* and *BCL2* and/or *BCL6* translocations. All BLs carried *MYC* translocation ($P < 0.001$), whereas LMO2 was only positive in 6/42 (14%) LBCL with *MYC* translocation ($P < 0.001$). The relationship between LMO2 negativity and *MYC* translocation was further analyzed in different subsets of tumors according to CD10 expression and cell of origin. Lack of LMO2 expression was associated with the detection of *MYC* translocations with high sensitivity (87%), specificity (87%), positive predictive value and negative predictive value (74% and 94%, respectively), and accuracy (87%) in CD10⁺ LBCL. Comparing LMO2 and *MYC* protein expression, all statistic measures of performance of LMO2 surpassed *MYC* in CD10⁺ LBCL. These findings suggest that LMO2 loss may be a good predictor for the presence of *MYC* translocation in CD10⁺ LBCL.

Key Words: LMO2, *MYC* rearrangement, lymphoma, immunohistochemistry

(*Am J Surg Pathol* 2017;41:877–886)

From the *Department of Pathology, Hematopathology Unit, Hospital del Mar, Institute of Investigacions Mediques-IMIM, University Pompeu Fabra; †Department of Pathology, Hematopathology Section, Hospital Clinic, Institute of Investigacions Biomediques Agust Pi Sunyer (IDIBAPS), University of Barcelona; ‡Department of Pathology, Hospital de Bellvitge-IDIBELL, Hospitalet de Llobregat; ¶Department of Pathology, Hospital de Sant Pau; #Microarray Analysis Service, Institute of Investigacions Mediques-IMIM, Barcelona; §Department of Pathology, Hospital Germans Trias i Pujol, Badalona; ||Department of Pathology, Hospital Mutua Terrassa, Terrassa, Spain; and **Institute of Pathology, Locarno, Switzerland.

Supported by grants from the Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (CICYT) SAF2015-64885-R and the Generalitat de Catalunya 2009SGR992 (E.C.), from Spanish Ministry of Economy and Competitiveness, Fondo de Investigación Sanitaria (FIS), Instituto de Salud Carlos III PI11/01621 (B.E.) and PI10/00366 (A.F.), and grant ACCIO-CIDEM RD08-2-0035 (L.C.).

Conflicts of Interest and Source of Funding: E.C. is an ICREA-Academia researcher of the Generalitat de Catalunya. For the remaining authors none were declared.

Correspondence: Luis Colomo, MD, Department of Pathology, Hematopathology Section, Hospital del Mar; Passeig Marítim 25-29, Barcelona 08003, Spain (e-mail: lcolomo@parcdesalutmar.cat).

Supplemental Digital Content is available for this article. Direct URL citations appear in the printed text and are provided in the HTML and PDF versions of this article on the journal's Website, www.ajsp.com.

Copyright © 2017 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) is an aggressive lymphoma with heterogenous clinical, morphologic, and genetic features, and it is the most common type of non-Hodgkin lymphoma (NHL) in western countries.¹ In the last decade, the addition of rituximab (R) to the conventional chemotherapy schemes has increased the survival of these patients by 10% to 15%.^{2–5} However, 30% to 40% of patients eventually die of the disease usually within 1 to 2 years after diagnosis and about 60% of patients with high-risk DLBCL are not cured. Many of these patients have DLBCL carrying *MYC* translocations, usually in the setting of tumors with complex karyotypes, and some with simultaneous translocations of *MYC* and *BCL2* and/or *BCL6* genes. The incidence of DLBCL with *MYC* translocations varies in the different published series between 6% and 15%.^{6,7} We and other authors have shown that the presence of *MYC* translocations in DLBCL confer unfavorable prognosis when the patients are treated with classic chemotherapy schemes for DLBCL, and most of these patients are the

ones who may die rapidly of disease.^{6,8–11} Therefore, the detection of *MYC* translocations is a relevant clinical need in DLBCL. Conventional G-banding cytogenetics (CC) and fluorescence in situ hybridization (FISH) are the most common techniques used to detect chromosomal alterations in clinical practice. CC requires cell cultures with dividing cells and resources for cytogenetics, whereas FISH is a technique that overcomes the need of cultures.¹² The relative low incidence of *MYC* translocations in DLBCL makes the genetic study of all these lymphomas cumbersome and has prompted strategies performing an initial screening step on the basis of immunophenotypic parameters for selecting cases with a higher probability of carrying the translocation.¹³ *MYC* protein expression and the Ki67 proliferative index have been suggested as potential selection markers. However, both parameters seem insufficient to capture all DLBCL cases with *MYC* translocations.¹³

Two simultaneous studies, published by the German consortium for the study of the “Molecular Mechanisms in Malignant Lymphomas Network Project of the Deutsche Krebshilfeand” (MMML) and the international consortium for the “Lymphoma/Leukemia Molecular Profiling Project” (LLMPP), defined the molecular signature of Burkitt lymphoma (mBL) on the basis of gene expression profiling (GEP).^{14,15} Both studies concluded that GEP is an accurate method for distinguishing Burkitt lymphoma (BL) from DLBCL, and identified some cases with mBL or intermediate signatures with morphologic features of DLBCL, or morphology that did not fulfill the features of BL or DLBCL. Such cases were classified by the authors as “high-grade lymphoma, NOS”, “mature aggressive B-cell NHL (B-NHL), unclassifiable,” or “discrepant” cases, and frequently carried *MYC* translocations and expressed CD10. These studies identified a BL-specific expression signature that included the downregulation of *LMO2*, a transcriptional factor normally expressed in follicular germinal center cells and germinal center-derived lymphomas.¹⁵

Our study arises from this paradoxical observation showing that, contrary to other germinal center (GC) markers such as CD10 and *BCL6*, *LMO2* protein expression was not observed in BL. On the basis of this finding and given that virtually all BLs carry the t(8:14) chromosomal translocation, we hypothesized that the lack of expression of *LMO2* in GC-derived lymphomas could be a surrogate marker of the *MYC* translocation. To confirm this hypothesis, we designed our study in two phases: first, we analyzed the *LMO2* gene expression in DLBCL and other high-grade lymphomas in relation to *MYC* genetic alterations using previously published gene expression data¹⁴; second, we performed an immunohistochemical study of *LMO2* in a large cohort of BL and large B-cell lymphomas (LBCLs) that included DLBCL and the new category of high-grade B-cell lymphoma (HGBL) with *MYC* and *BCL2* and/or *BCL6* translocations, in which we also studied the status of *MYC*, *BCL2*, and *BCL6* genes by FISH.¹⁶ With this approach, we

observed that *LMO2* expression was uncommon in cases carrying *MYC* translocations.

MATERIALS AND METHODS

Case Selection

We included in the study 46 patients with BL (34 male [M]/12 female [F]; median age, 28 y, range, 3 to 65 y), 268 patients with DLBCL (143 M/125 F; median age, 60 y, range, 21 to 91 y), and 16 patients with HGBL with *MYC* and *BCL2* and/or *BCL6* translocations (14 M/2 F; median age, 57 y, range, 33 to 87 y) diagnosed according to the World Health Organization classification and considering the modifications of the recent update of the classification.^{16,17} The cases were diagnosed between 2000 and 2014 and were retrieved from the files of the institutions of the Grup d’Estudi de Limfomes de Catalunya I Balears (GELCAB), with the only criterion of the availability of adequate histologic material. The main clinical features of patients are summarized in Table 1. Among BL cases with available clinical information, 19/39 (49%) were pediatric. Transformed low-grade lymphomas were not included in this series. The study was prospectively and retrospectively performed and was approved by the Ethic committee of the Hospital Clinic of Barcelona. Informed consent to use both clinical data and histologic material was obtained in accordance with the Declaration of Helsinki.

Gene Expression Data and Statistical Analysis

GEP data were obtained from the Gene Expression Omnibus of the National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/) through GEO accession number GSE4475, as indicated in the study of Hummel et al.¹⁴ In this database that contained genetic information on *MYC* status, we identified *LMO2* probe sets and, therefore, compared the expression of this gene in cases with rearranged and wild-type *MYC* along with the different classifiers defined by histology and molecular profiling.

Of note, the study of Hummel et al¹⁴ was published in 2006 and, therefore, used the terminology of 2001 World Health Organization classification. In our study, we have not modified the original terminology used for the diagnosis.

Immunohistochemistry

Overall, 122 cases were studied in whole-tissue sections, 208 in tissue microarrays (TMAs), and 80 cases in whole-tissue sections and TMAs. TMAs included two 1-mm representative cores of each case and were constructed using a tissue arrayer (MTA I; Beecher Instruments). Immunohistochemical studies were performed with a panel of monoclonal and polyclonal antibodies reactive in paraffin-embedded TMA sections using a peroxidase-labeled detection system, standard antigen retrieval protocols, and automated immunostainer (Dako Autostainer, Denmark). Standard methods for tissue fixation (10% buffered formalin) and processing were used in the participating centers. The panel of

TABLE 1. Clinical and Immunohistochemical Features, and MYC Gene Alterations Detected by FISH in BL, DLBCL, and HGBL With MYC and BCL2 and/or BCL6 Translocations

	n/N (%)		
	BL (N = 46)	DLBCL (N = 268)	HGBL (N = 16)
Clinical			
Median age (y)	28	60	57
Sex (male/female)	34/12	143/125	14/2
Primary extranodal	30/46 (65)	114/261 (44)	8/16 (50)
HIV+	8/16 (50)	6/218 (3)	0/11
IHC			
CD10 ⁺	46/46 (100)	83/268 (31)	15/16 (94)
BCL6 ⁺	37/37 (100)	188/256 (73)	15/16 (94)
BCL2 ⁺	2/42 (5)	160/248 (64.5)	14/15 (93)
MUM1/IRF4 ⁺	7/20 (35)	133/245 (54)	5/14 (36)
LMO2 ⁺	1/46 (2)	146/268 (54.5)	2/16 (12.5)
MYC ⁺	27/30 (90)	51/181 (28)	7/10 (70)
EBV ⁺	11/25 (44)	8/76 (10)	0/11
FISH			
MYC-N	0/46	180/268 (67)	0/16
MYC-R	46/46 (100)	26/268 (10)	16/16 (100)
MYC-G	0/46	52/268 (19)	0/16
MYC-A	0/46	10/268 (4)	0/16
BCL2-R	0/33	35/236 (15)	16/16 (100)
BCL6-R	0/34	47/206 (23)	2/16 (17)

BCL2-R indicates BCL2 rearranged; BCL6-R, BCL6 rearranged; MYC-A, MYC amplification; MYC-G, MYC gained; MYC-N, MYC nonrearranged; MYC-R, MYC rearranged.

antibodies included common B and T-cell markers as well as CD10 (clone 56C6), MUM1/IRF4 (clone MUM1p), BCL2 (clone 124), and Ki67 (clone MIB-1) all from Dako, BCL6, kindly provided by Dr Roncador (CNIO, Spain), and MYC (clone Y69, Epitomics). The conditions and the evaluation for all these antibodies were the same as previously described, and they were assessed following the guidelines recommended for their interpretation by the Lunenburg Lymphoma Biomarker Consortium; appropriate internal controls were used in the evaluation of the immunostains.^{6,18} MYC immunostaining was also evaluated in a semiquantitative manner, and the cutoff considered positive was 40%, as reported previously.^{6,19}

LMO2 was studied using clone 1A9-1 (Ventana, Roche, Tucson, AZ), which was incubated for 40 minutes after the antigen retrieval with CC1 solution for 60 minutes, and detected by ultraView Universal DAB Detection Kit in an automated immunostainer (Benchmark XT; Ventana). LMO2 immunostaining was evaluated following the Natkunam et al²⁰ cutoff criteria and cases with a staining over 30% of lymphoma cells were assigned as positive. The immunohistochemical study included the identification of the cell of origin (COO) for DLBCL cases by the Hans algorithm.²¹

Fluorescence In Situ Hybridization

FISH was performed and evaluated as previously described, following the criteria of Ventura et al^{6,22} Two different break-apart probes (BAP) specific for MYC (8q24) from Vysis (Abbott Molecular, IL) and from Dako (Denmark) were applied in 91 and in 195 cases, respectively. A dual fusion probe specific for

IGH/MYC/CEP8 from Vysis (Abbott Molecular) was used in 77 cases. Thirty-one cases were studied simultaneously by 2 probes (BAP Vysis and Dako), and in 30 (97%) we obtained concordant results. FISH using BAP for BCL2 and BCL6 genes and dual fusion IGH/BCL2 were performed as previously described.²³ The cutoff values for the interphase FISH analyses were established following the criteria of Ventura, and the criteria for gains and amplifications were the same as reported previously.^{6,22}

Statistical Analysis

Data were compared using χ^2 test, unpaired *t* tests, or nonparametric tests, when necessary. *P*-values < 0.05 were considered statistically significant for all tests. Accuracy, sensitivity, specificity, and positive predictive value (PPV) and negative predictive value of LMO2 were calculated for 284 patients with LBCL. Likelihood positive and negative ratios were calculated to evaluate the diagnostic accuracy of the results obtained.²⁴ For analytical purposes and because our usual workflow in lymphoma diagnosis indicates cytogenetics as a second step after the immunohistochemical results, we analyzed the HGBL with MYC and BCL2 and/or BCL6 translocations together with the DLBCL group and designated the whole group as LBCL.

The Classification and Regression Trees strategy was used to generate a classification algorithm on the basis of CD10 and LMO2 expression assessed by immunohistochemistry (IHC). The R packages rpart and rpart.plot were used to obtain the best classifier.^{25,26} To obtain the error rate, 1000 bootstrap resampling steps were performed.

RESULTS

LMO2 Gene Expression is Downregulated in BL and DLBCL Carrying MYC Translocations

We initially explored the previous MMML GEP study of BL and DLBCL in which *MYC* translocation information was available to determine the possible relationship between these rearrangements and *LMO2* expression. The MMML study included 220 patients with annotated clinicopathologic, genetic, and molecular features.¹⁴ Information on *MYC* gene status was available in 7 BL cases, 23 atypical BL cases, 18 aggressive B-NHL cases, unclassifiable cases, and 161 DLBCL cases. Considering the whole series, *LMO2* expression was significantly higher in *MYC* nonrearranged than that in *MYC* rearranged tumors (mean, SD: 9.35 ± 1.41 vs. 7.77 ± 1.41 , respectively) ($P < 0.001$) (Fig. 1A and Supplementary Table 1, Supplemental Digital Content 1, <http://links.lww.com/PAS/A488>).

When *LMO2* expression was examined in the different histologic subtypes included in the MMML study, it was also lower in the subtypes with *MYC* rearrangement (Fig. 1B, Supplementary Table 1, Supplemental Digital Content 1, <http://links.lww.com/PAS/A488>).

The GEP studies based on the COO, performed in 179 cases (161 DLBCL and 18 aggressive B-NHL), showed that germinal center B-cell–like (GCB) DLBCL and intermediate cases had significant higher levels of *LMO2* in *MYC* nonrearranged than in *MYC* rearranged cases ($P < 0.001$) (Fig. 1C). *LMO2* expression was significantly lower in activated B-cell than in GCB or unclassifiable DLBCL with unrearranged *MYC* ($P < 0.001$) and remained at similar low levels in cases with *MYC* rearrangements (Fig. 1C and Supplementary Table 1, Supplemental Digital Content 1, <http://links.lww.com/PAS/A488>). The results did not change in the analyses performed only in the cohort of 161 DLBCL cases (data not shown).

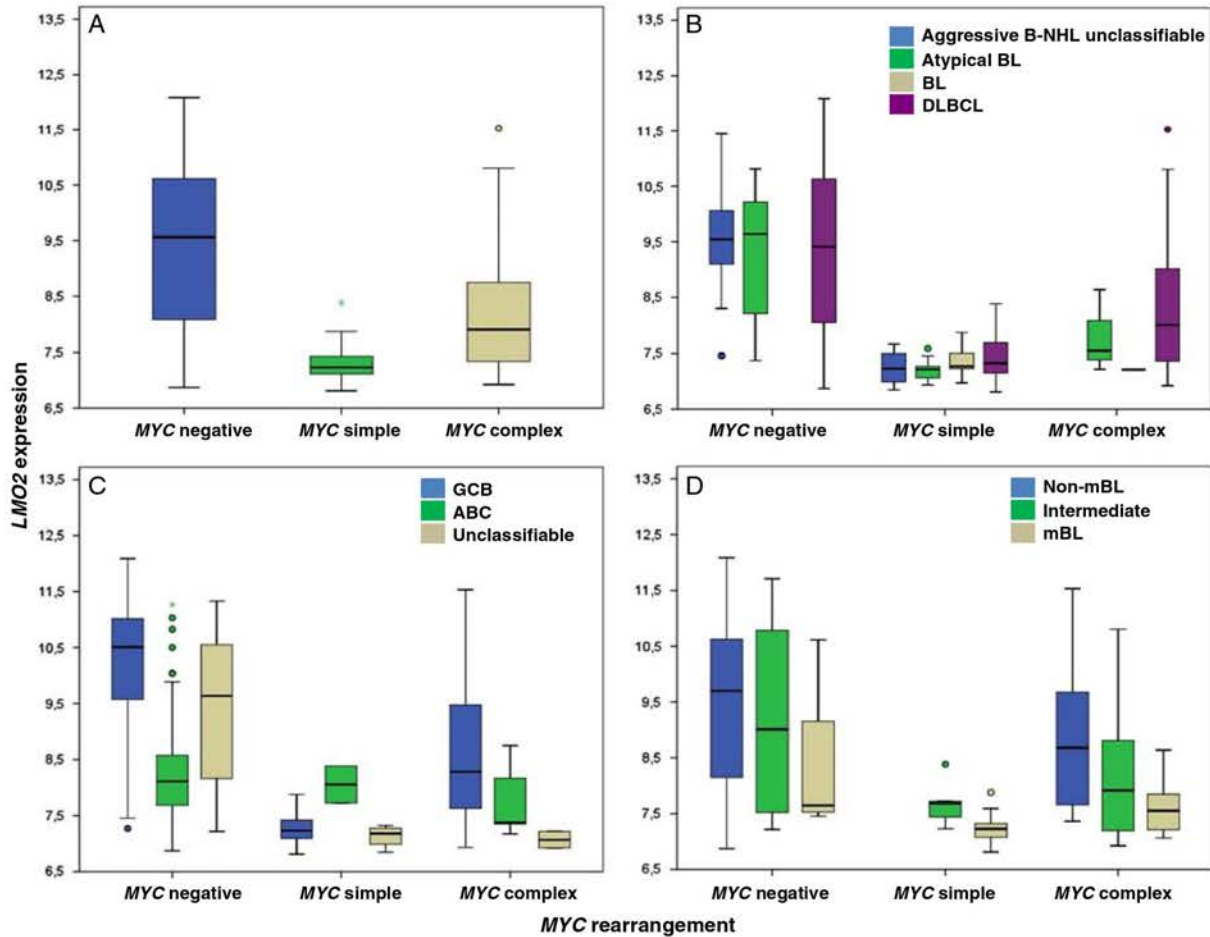


FIGURE 1. *LMO2* gene expression in cases included in Hummel et al GEP study¹² according to *MYC* gene status. A, Whole series, including together BL and DLBCL. B, *LMO2* expression by histologic classification. C, *LMO2* expression based on the cell-of-origin classification. D, *LMO2* expression based on the expression of the molecular BL signature; *MYC* simple, IG/*MYC* fusions, and low chromosomal complexity score (< 6 chromosomal imbalances by array-CGH) and no IGH/*BCL2* fusion or *BCL6* breakpoint; *MYC* complex, non-IG/*MYC* fusions or lymphomas with IG/*MYC* fusions with high chromosomal complexity score (≥ 6), an IGH/*BCL2* fusion, or *BCL6* breakpoint, or any combination of these.

Finally, we also evaluated *LMO2* expression according to *MYC* status in the groups defined by the mBL signature. Again, the lowest levels of *LMO2* occurred in cases with *MYC* rearrangements as well as in *MYC* non-rearranged tumors with an mBL signature (Fig. 1D and Supplementary Table 1, Supplemental Digital Content 1, <http://links.lww.com/PAS/A488>). All these observations suggested a relationship between *LMO2* expression and *MYC* rearrangements, and prompted us to study *LMO2* protein expression in BL and DLBCL.

LMO2 Protein Expression is Low or Negative in BL and LBCL Cases With MYC Translocations

The main clinical and immunohistochemical results of 330 cases studied are summarized in Table 1. All 46 BL cases analyzed expressed CD10 and BCL6 and were BCL2 negative, except 2 cases, which weakly expressed BCL2. The *MYC* protein was expressed in >40% of cells in 27/30 (90%) BL cases. By FISH, the *MYC* gene was rearranged in all cases. Of note, *LMO2* was negative in 45/46 cases (98%) of BL (Fig. 3). The positive case was a nodal BL occurring in an HIV-positive patient, which had a classic immunophenotype with CD10 and BCL6 expression, and in which *MYC* was translocated.

Among LBCLs, 268 cases were classified as DLBCL and 16 as HGBL with *MYC* and *BCL2* and/or *BCL6* translocations. In the group of DLBCL, 207/268 cases (77%) were classified as centroblastic, 19 (7%) as immunoblastic, and 42 (16%) as other variants. The phenotype of these tumors included CD10 positivity in 83/268 (31%), BCL6 positivity in 188/256 (73%), and MUM1/IRF4 positivity in 133/245 (54%). Among 249 cases with complete data, 142 (57%) had GCB profile and 107 (43%) were non-GCB. BCL2 was expressed in

160/248 cases (64.5%) and *MYC* in 51/181 (28%) cases with available information. *LMO2* was expressed in 146/268 (54.5%) cases. The results of the *MYC* study by FISH in 268 DLBCL cases is shown in Table 1. Twenty-six cases (10%) had translocations, 52 (19%) had gains, and 10 (4%) showed *MYC* amplification, whereas 180 (67%) cases did not show *MYC* alterations.

On histologic grounds, HGBL with *MYC* and *BCL2* and/or *BCL6* translocations were classified as centroblastic in 9/16 (56%) cases, immunoblastic in 3/16 (19%), and 4/16 (25%) had morphologic features resembling BL. CD10 and BCL6 were expressed in 15/16 (94%) cases, MUM1/IRF4 in 5/14 (36%), BCL2 in 14/15 (93%), *LMO2* in 2/16 (12.5%), and *MYC* in 7/10 (70%). All cases had concurrent *MYC* and *BCL2* translocations, and 2 cases had additional translocations of *BCL6*.

In most *LMO2*-positive cases, the tumors had diffuse and homogenous expression of the protein in the majority of the atypical cells. The endothelial cells served as internal control of the staining. The analysis of the correlations between *LMO2* expression and *MYC* gene status in the whole series of LBCL are shown in Table 2 and Fig. 2. Remarkably, 36/42 (86%) cases with *MYC* translocations were *LMO2* negative, whereas it was negative in 100/242 cases (41%) without this alteration ($P < 0.001$) (Table 2). Among other *LMO2*-negative cases, 25/62 (40%) had numerical abnormalities and 75/180 (42%) had normal *MYC* cytogenetics, suggesting that the lack of expression of the protein may be preferentially associated with rearrangements of the gene (Fig. 3). On the contrary, only 6/42 (14%) cases with *MYC* translocations were *LMO2* positive. Those cases occurred in 4 DLBCL cases and 2 HGBL cases with *MYC* and *BCL2* and/or *BCL6* translocations. Two

TABLE 2. Incidence of LMO2 Protein Expression Related to the Presence of MYC Gene Alterations in LBCL Based on CD10 Expression and Hans Algorithm

	MYC	n/N (%)	
		LMO2 ⁺	LMO2 ⁻
All cases ($P < 0.001$) (N = 284)	N	105/180 (58)	75/180 (42)
	R	6/42 (14)	36/42 (86)
	G	32/52 (62)	20/52 (38)
	A	5/10 (50)	5/10 (50)
CD10 ⁺ LBCL ($P < 0.001$) (N = 98)	N	46/54 (85)	8/54 (15)
	R	4/30 (13)	26/30 (87)
	G	11/11 (100)	0/11
	A	2/3 (67)	1/3 (33)
CD10 ⁻ LBCL ($P = 0.213$) (N = 186)	N	59/126 (47)	67/126 (53)
	R	2/12 (17)	10/12 (83)
	G	21/41 (51)	20/41 (49)
	A	3/7 (42)	4/7 (57)
GCB IHC ($P < 0.005$) (N = 157)	N	68/95 (72)	27/95 (28)
	R	6/35 (17)	29/35 (83)
	G	19/21 (90.5)	2/21 (9.5)
	A	4/6 (67)	2/6 (33)
Non-GCB IHC ($P = 0.421$) (N = 108)	N	29/72 (40)	43/72 (60)
	R	0/3	3/3 (100)
	G	12/29 (41)	17/29 (59)
	A	1/4 (25)	3/4 (75)

A indicates *MYC* amplification; G, gains of *MYC*; N, *MYC* nonrearranged; R, *MYC* rearranged.

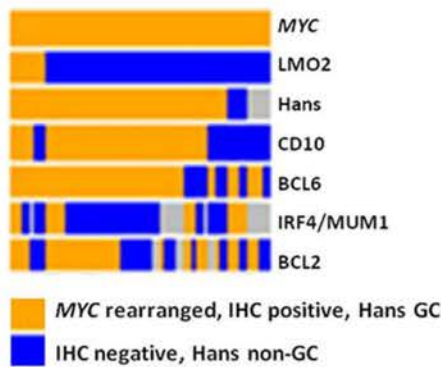


FIGURE 2. Relationship between the presence of *MYC* rearrangements in DLBCL and the expression of different immunohistochemical markers and cell of origin according to the Hans algorithm. Gray boxes indicates not done.

DLBCL cases (1 $CD10^+$ and 1 $CD10^-$) had partial loss of LMO2 expression, but $>30\%$ of the neoplastic cells were positive, whereas the other 2 cases expressed LMO2 in most atypical cells. Both HGBL with *MYC* and *BCL2* and/or *BCL6* translocations were $CD10^+$ and expressed LMO2 in most neoplastic cells. There were no distinctive clinicopathologic features between the LMO2-positive cases with *MYC* rearrangements and the LMO2-negative cases.

The Absence of LMO2 Expression Identifies *MYC* Translocations in $CD10^+$ Cases and LBCL of GCB Subtype

As GEP studies showed that most DLBCLs with *MYC* translocations occurred in $CD10^+$ cases,^{14,15} we examined whether the robustness of our approach could be refined, separating our cases on the basis of $CD10$ expression. The results, based on 284 cases, are shown in Tables 2 and 3. LMO2 was negative in 26/30 (87%) of LBCL with *MYC* rearrangements but was negative only in 9/68 (13%) $CD10^+$ LBCL without this alteration ($P < 0.001$) (Table 2). We observed similar sensitivity values in $CD10^+$ LBCL and $CD10^-$ LBCL (87% vs. 83%, respectively) but higher specificity, PPV, and accuracy for the profile $CD10^+/LMO2^-$ compared with $CD10^-/LMO2^-$ cases (specificity 87% vs. 47%, PPV 74% vs. 10%, and accuracy 87% vs. 50% for $CD10^+$ LBCL and $CD10^-$ LBCL, respectively; $P < 0.05$) (Table 3). Moreover, the likelihood positive and negative ratios were of 6.69 and 0.014 in the $CD10^+$ group, respectively (Table 3).

In addition, we studied the correlations between LMO2 and *MYC* rearrangements in the immunohistochemical COO LBCL subtypes (Table 2). Among 265 cases with complete information, which included the HGBL cases with *MYC* and *BCL2* and/or *BCL6* translocations, there were 157 LBCL with GCB profile and 108 non-GCB profile. In GCB cases, LMO2 protein expression was negative in 29/35 (83%) tumors with *MYC* rearrangements compared with 31/122 (25%) *MYC*

nonrearranged cases ($P < 0.005$). Among non-GCB LBCL, 3/3 *MYC* rearranged cases and 63/105 (60%) *MYC* nonrearranged cases were LMO2 negative ($P = 0.421$). The statistical measures of the performance of GCB LBCL were higher than in non-GCB LBCL, but lower if compared with the $CD10^+$ group (specificity 87% vs. 75%; PPV 74% vs. 48%; accuracy 87% vs. 76%; positive likelihood ratio 6.69 vs. 3.26; negative likelihood ratio 0.14 vs. 0.23, respectively) (Table 3).

Simultaneous information of *MYC* and LMO2 proteins and *MYC* gene alterations were available in 191 cases (Supplementary Table 2, Supplemental Digital Content 2, <http://links.lww.com/PAS/A489> and Supplementary Table 3, Supplemental Digital Content 3, <http://links.lww.com/PAS/A490>). Among 58 cases with *MYC* protein expression, only 16 (27%) had *MYC* translocations, whereas 9 (15%) had *MYC* gains, and 33 (57%) did not have *MYC* gene alterations. All statistic measures of performance for *MYC* protein expression obtained lower results than LMO2 in the group of $CD10^+$ LBCL (sensitivity 93% vs. 73%; specificity 88% vs. 66%; PPV 74% vs. 44%; negative predictive value 97% vs. 87%; accuracy 89% vs. 68%; positive likelihood ratio 7.75 vs. 2.14; negative likelihood ratio 0.07 vs. 0.40, respectively) (Supplementary Table 3, Supplemental Digital Content 3, <http://links.lww.com/PAS/A490>). However, the specificity (42% vs. 78%), PPV (6% vs. 15%), accuracy (44% vs. 78%) and both likelihood ratios (positive likelihood ratio 1.43 vs. 3.77; negative likelihood ratio 0.40 vs. 0.21) were higher for *MYC* overexpression than for LMO2 in the $CD10^-$ group, suggesting that *MYC* protein expression can be useful to identify *MYC* translocations in such cases (Supplementary Table 3, Supplemental Digital Content 3, <http://links.lww.com/PAS/A490>).

Finally, we wanted to know whether the combination of $CD10$ and LMO2 expression was a robust predictor of the presence of *MYC* translocation in LBCL. On the basis of these variables, 259 cases (91.2%) were correctly classified and only 25 (8.8%) cases were not correctly classified (Fig. 4). After resampling, the mean error rate was of 9.9%, indicating over 90% of probability for the detection of *MYC* translocations in DLBCL cases based on the $CD10^+/LMO2^-$ profile. Of note, none of the cases was classified in the opposite category.

DISCUSSION

In this study, we show that LMO2 may be a useful marker that may help to identify *MYC* translocations in LBCL and may assist in the differential diagnosis of BL. *MYC* translocation is one of the defining features of BL, is part of the definition of the new category of HGBL with *MYC* and *BCL2* and/or *BCL6* translocations,¹⁶ and occurs in 6 to 15% DLBCL.⁶ The presence of this translocation identifies a subset of DLBCL with a more aggressive biological behavior.^{6,8-11} In daily practice, conventional cytogenetics and FISH are the most common techniques used to detect chromosomal alterations.

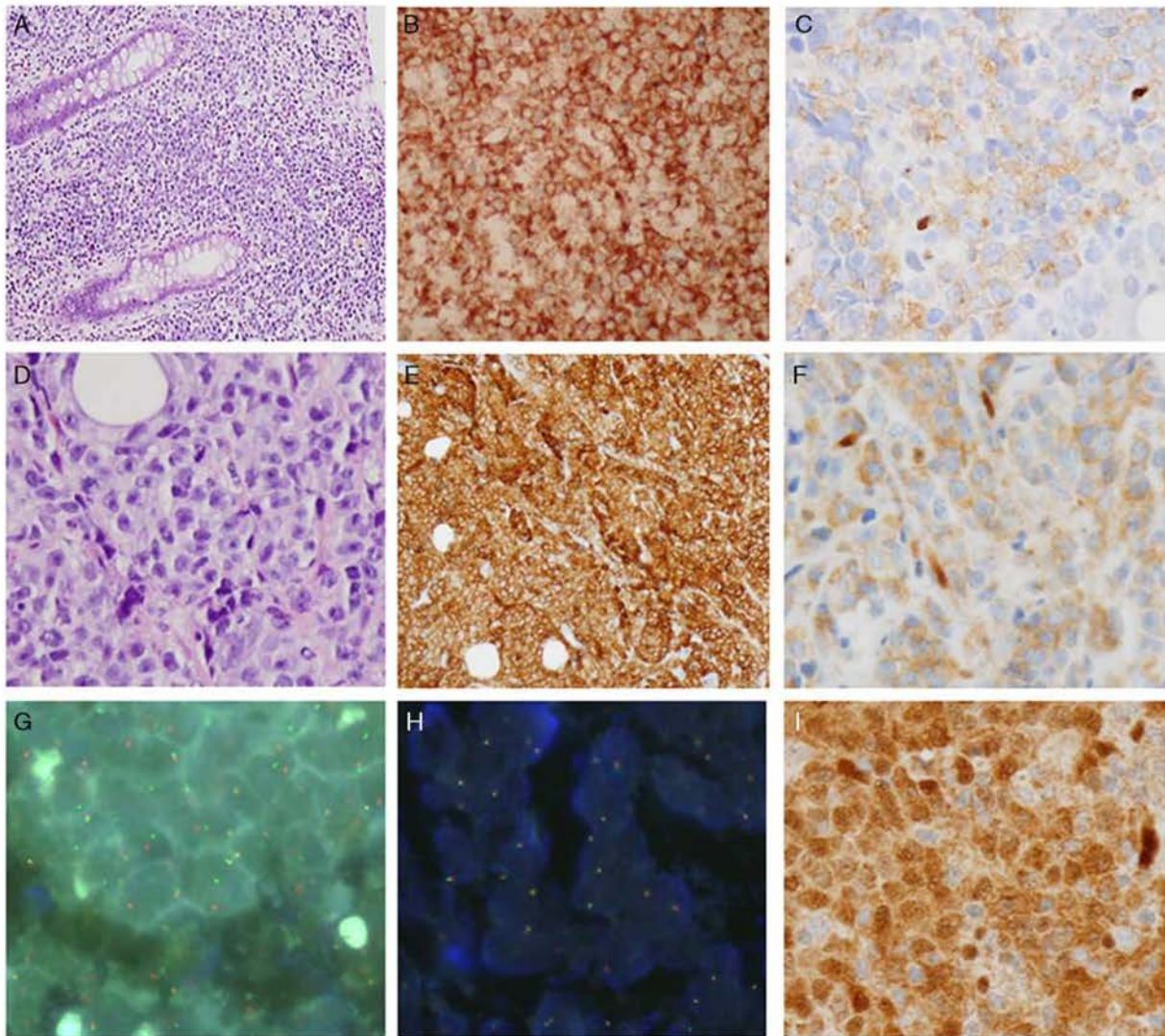


FIGURE 3. BL showing (A) CD10 expression (B) but not LMO2 expression (C); DLBCL (D), CD10⁺ (E) and LMO2 negative with (F) MYC rearrangement (G); DLBCL with MYC nonrearranged (H), LMO2 positive (I).

However, the low incidence of *MYC* translocations in DLBCL makes the study of this alteration in all cases cumbersome; therefore, surrogate markers that may help

to identify *MYC* rearrangements are necessary. As consensus guidelines have not yet been provided, our results may be useful as they indicate that the absence of LMO2

TABLE 3. Statistic Measures of the Performance of LMO2 Protein Expression Compared With the Presence of *MYC* Gene Rearrangements as Gold Standard in 284 LBCL

	All Cases (N = 284)	CD10 ⁺ (N = 98)	CD10 ⁻ (N = 186)	GCB IHC (N = 157)	Non-GCB IHC (N = 108)
Sensitivity	86	87	83	83	100
Specificity	57	87	47	75	40
PPV	26	74	10	48	5
NPV	96	94	98	93	100
Accuracy	63	87	50	76	42
Positive likelihood ratio	2	6.69	1.56	3.26	1.67
Negative likelihood ratio	0.24	0.14	0.36	0.23	0.00

CD10⁻ indicates LBLCL without CD10 expression; CD10⁺, LBLCL with CD10 expression.

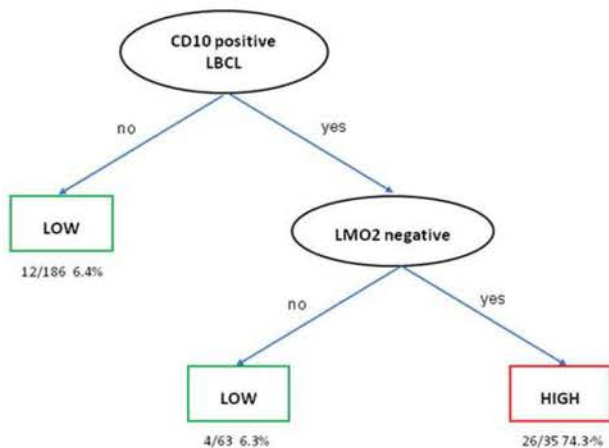


FIGURE 4. Tree indicating the probability of LBCL with *MYC* rearrangement based on the immunohistochemical expression of CD10 and LMO2. The numbers under the leaves indicate number of cases with *MYC* rearrangement/total number of cases in the arm.

expression in LBCL, particularly CD10⁺ or with a GCB phenotype, may be a useful tool to select cases for further FISH studies.

We have also observed that the absence of LMO2 expression may be particularly helpful for the diagnosis of BL. In this series, we found only 1 positive BL of the 46 studied using a cutoff of 30%. This is consistent with data obtained from GEP studies, which have shown low levels of *LMO2* gene expression in BL.^{14,15} At the protein level, there are only 3 studies that evaluate LMO2 expression in BL and include few number of cases.^{20,27,28} Natkunam and colleagues and Agostinelli and colleagues characterized 2 different clones of LMO2 and assessed the specificity and efficacy of their antibodies. In both studies, LMO2 was expressed in 5/10 (50%) and 13/32 (41%) cases of BL, and in 1 of the 3 BL cell lines (Raji, but it was negative in Ramos and Daudi). Both studies used a cutoff score of 30% and the detection was carried out by the Dako Envision method.^{18,27} The third study included 5 BL cases, used a cutoff score of 60% and the Ventana-Roche automated immunostaining system as ours, and LMO2 was only expressed in 1 case (20%).²⁸ The reasons for the differences in the detection of LMO2 in BL among these studies are not completely clear, although the antibodies and detection systems were slightly different. In addition, none of these previous studies correlated the findings with the presence of *MYC* rearrangements. GEP studies have shown significant lower levels of *LMO2* expression in BL compared with DLBCL, suggesting that the differences observed by IHC may be related to the sensitivity of the methodology. Altogether, the results of these studies and ours suggest that LMO2 protein expression decreases and may be lost in BL, and warrant further studies to validate the utility of this finding as a surrogate marker of *MYC* translocations in BL and its value in the differential diagnosis with other high-grade lymphomas.

In addition, we have observed that the absence of LMO2 expression is a sensitive marker to detect *MYC* translocations in LBCL, and that the values of specificity, PPV, and accuracy increase remarkably in cases with CD10⁺/LMO2⁻ profile. The results we have obtained at the protein level are consistent with data obtained from the study of Hummel et al.¹⁴ Gene expression studies performed in normal B-cell subpopulations and DLBCL have shown that LMO2 is highly expressed in germinal center cells and in GCB DLBCL.^{29–31} The results of protein expression may be consistent with mRNA data, as we observed LMO2 expression in most CD10⁺ and GCB DLBCL. The incidence of LMO2 expression in our series of DLBCL was 54.5% and closely related to the GCB profile, similar to the previous studies reported.^{20,27,32} However, we showed that most cases carrying *MYC* translocations were negative or had only low levels of LMO2, suggesting that the loss of expression of LMO2 by IHC may be a useful biomarker for the detection of this genetic alteration. The clinical utility of this finding is especially high for CD10⁺ and GCB-derived cases, as most of the GCB DLBCL with wild-type *MYC* have high levels of LMO2 expression. Alternatively, the presence of LMO2 expression in CD10⁻ and non-GCB cases, which occurred in approximately 40% of cases, may be useful to predict the absence of *MYC* translocations. Thus, although LMO2 expression in ABC DLBCL is normally low, CD10⁻ and non-GCB DLBCL cases with expression of LMO2 protein had *MYC* rearrangements in <5% of cases. These results are tempting to suggest that the ability to capture *MYC* translocations among GCB cases lacking LMO2 expression may correlate with the prognostic utility of the marker.³²

Compared with *MYC* staining, the statistical analyses showed better results for LMO2 than *MYC* to recognize *MYC* translocations, particularly in the CD10⁺ group. In such group of cases all LMO2 results surpassed *MYC* results, indicating an advantage for LMO2 study. This may be relevant as most HGBL cases with *MYC* and *BCL2* and/or *BCL6* translocations and DLBCL carrying *MYC* translocations express CD10. Moreover, recent studies have shown that *MYC* protein expression can be influenced by the characteristics of *MYC* rearrangements, and cases with *MYC* complex FISH patterns or *MYC* non-*IGH* rearrangements downregulate *MYC* protein expression.^{33,34} In contrast, the complexity of *MYC* rearrangements in such lymphomas may not be captured by all FISH probes and lack of LMO2 expression may add information in *MYC*-negative tumors.³⁵ Thus, we wanted to know whether a classifier based on the combination of CD10 and LMO2 expression could be a predictor of the presence of *MYC* translocation using Classification and Regression Trees strategy. Although this approach was not perfect for detecting all translocated tumors, 90% of cases were correctly classified, suggesting that the addition of LMO2 expression to the diagnostic workflow of LBCL may be a useful tool for identifying LBCL cases carrying *MYC* translocations.

The precise mechanism that causes the down-regulation of LMO2 in cases with *MYC* rearrangements in aggressive B-cell lymphomas is not known. The GEP studies indicate that the global mRNA levels are lower in *MYC* rearranged cases. However, other mechanisms may occur. Cubedo et al³⁶ described the transcriptome and interacting partners of LMO2 in DLBCL and showed that LMO2 forms transcriptional complexes that may include proteins that have been shown to interact directly with *MYC* in other studies, such as E2A, LDB1, or SP1.^{37,38} One possibility would be that the presence of high levels of *MYC* protein in *MYC* rearranged cases may limit the accessibility of LMO2 to form transcriptional complexes. However, 50% of cases with *MYC* amplifications in our series expressed LMO2, suggesting that additional mechanisms control LMO2 expression. Natkunam et al²⁰ found high *LMO2* mRNA expression in a BL cell line (Ramos cell line) and low protein expression by immunoblotting, suggesting that in BL *LMO2* may be also regulated at the posttranscriptional level. Thus, our observation remains a correlation and further studies are necessary to clarify the differences in LMO2 expression observed in our study.

In summary, our results indicate that the absence of LMO2 expression may be a useful marker to identify *MYC* translocations, and therefore it may help in the differential diagnosis of BL and to identify LBCL carrying *MYC* translocations. We suggest that the use of LMO2 expression together with CD10 and COO markers in LBCL may assist in the selection of cases with high probability of *MYC* translocation that would benefit of FISH analysis.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank Montserrat Tortosa, Monica Marin, Laura Gelabert, and Lola Tobalina for their excellent technical assistance and English editing.

REFERENCES

1. A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma. The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *Blood*. 1997;89:3909–3918.
2. Coiffier B, Lepage E, Briere J, et al. CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med*. 2002;346:235–242.
3. Habermann TM, Weller EA, Morrison VA, et al. Rituximab-CHOP versus CHOP alone or with maintenance rituximab in older patients with diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol*. 2006;24:3121–3127.
4. Pfreundschuh M, Trümper L, Osterborg A, et al. CHOP-like chemotherapy plus rituximab versus CHOP-like chemotherapy alone in young patients with good-prognosis diffuse large-B-cell lymphoma: a randomised controlled trial by the MabThera International Trial (MInT) Group. *Lancet Oncol*. 2006;7:379–391.
5. Sehn LH, Donaldson J, Chhanabhai M, et al. Introduction of combined CHOP plus rituximab therapy dramatically improved outcome of diffuse large B-cell lymphoma in British Columbia. *J Clin Oncol*. 2005;23:5027–5033.
6. Valera A, Lopez-Guillermo A, Cardesa-Salzman T, et al. MYC protein expression and genetic alterations have prognostic impact in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with immunotherapy. *Haematologica*. 2013;98:1554–1562.
7. Ott G, Rosenwald A, Campo E. Understanding MYC-driven aggressive B-cell lymphomas: pathogenesis and classification. *Blood*. 2013;122:3884–3891.
8. Tzankov A, Xu-Monette ZY, Gerhard M, et al. Rearrangements of MYC gene facilitate risk stratification in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with rituximab-CHOP. *Mod Pathol*. 2014;27:958–971.
9. Horn H, Ziepert M, Becher C, et al. MYC status in concert with BCL2 and BCL6 expression predicts outcome in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 2013;121:2253–2263.
10. Barrans S, Crouch S, Smith A, et al. Rearrangement of MYC is associated with poor prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated in the era of rituximab. *J Clin Oncol*. 2010;20:3360–3365.
11. Savage KJ, Johnson NA, Ben-Neriah S, et al. MYC gene rearrangements are associated with a poor prognosis in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with R-CHOP chemotherapy. *Blood*. 2009;114:3533–3537.
12. Puiggros A, Puigdecenet E, Salido M, et al. Genomic arrays in chronic lymphocytic leukemia routine clinical practice: are we ready to substitute conventional cytogenetics and fluorescence in situ hybridization techniques? *Leuk. Lymphoma*. 2013;54:986–995.
13. Swerdlow SH. Diagnosis of “double hit” diffuse large B-cell lymphoma and B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between DLBCL and Burkitt lymphoma: when and how, FISH versus IHC. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2014;2014:90–99.
14. Hummel M, Bentink S, Berger H, et al. A biologic definition of Burkitt's lymphoma from transcriptional and genomic profiling. *N Engl J Med*. 2006;354:2419–2430.
15. Dave SS, Lam LT, Kluin P, et al. Molecular diagnosis of Burkitt's lymphoma. *N Engl J Med*. 2006;354:2431–2442.
16. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, et al. The 2016 revision of the World Health Organization (WHO) classification of lymphoid neoplasms. *Blood*. 2016;127:2375–2390.
17. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL EA. *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. Lyon, France: IARC Press; 2008.
18. de Jong D, Xie W, Rosenwald A, et al. Retracted: immunohistochemical prognostic markers in diffuse large B-cell lymphoma: validation of tissue microarray as a prerequisite for broad clinical applications (a study from the Lunenburg Lymphoma Biomarker Consortium). *J Clin Pathol*. 2008;62:128–138.
19. Johnson NA, Slack GW, Savage KJ, et al. Concurrent expression of MYC and BCL2 in diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone. *J Clin Oncol*. 2012;30:3452–3459.
20. Natkunam Y, Zhao S, Mason DY, et al. The oncoprotein LMO2 is expressed in normal germinal-center B cells and in human B-cell lymphomas. *Blood*. 2007;109:1636–1642.
21. 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.
22. Ventura RA, Martin-Subero JI, Jones M, et al. FISH Analysis for the detection of lymphoma-associated chromosomal abnormalities in routine paraffin-embedded tissue. *J Mol Diagn*. 2006;8:141–151.
23. Valera A, Balagué O, Colomo L, et al. IG/MYC rearrangements are the main cytogenetic alteration in plasmablastic lymphomas. *Am J Surg Pathol*. 2010;34:1686–1694.
24. McGee S. Simplifying likelihood ratios. *J Gen Intern Med*. 2002;17:647–650.
25. Breiman L, Friedman JH, Olshen RA, Stone CJ, eds. *Classification and Regression Trees*. CA: Wadsworth International Group; 1984.
26. Therneau TM, Atkinson B, Ripley BD. *rpart: Recursive Partitioning*. Rpart Packag. manual. *R Packag*. 2015;4:1–10.
27. Agostinelli C, Paterson JC, Gupta R, et al. Detection of LIM domain only 2 (LMO2) in normal human tissues and haematopoietic and non-haematopoietic tumours using a newly developed rabbit monoclonal antibody. *Histopathology*. 2012;61:33–46.

28. Menter T, Gasser A, Juskevicius D, et al. Diagnostic utility of the germinal center-associated markers GCET1, HGAL, and LMO2 in hematology neoplasms. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2015;23:491–498.
29. 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 US A*. 2003;100:9991–9996.
30. 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.
31. 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.
32. Natkunam Y, Farinha P, Hsi ED, et al. LMO2 protein expression predicts survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with anthracycline-based chemotherapy with and without rituximab. *J Clin Oncol*. 2008;26:447–454.
33. Copie-Bergman C, Cuillière-Dartigues P, Baia M, et al. MYC-IG rearrangements are negative predictors of survival in DLBCL patients treated with immunochemotherapy: a GELA/LYSA study. *Blood*. 2015;126:2466–2474.
34. Valera A, Epistolio S, Colomo L, et al. Definition of MYC genetic heteroclonality in diffuse large B-cell lymphoma with 8q24 rearrangement and its impact on protein expression. *Mod Pathol*. 2016;29:844–853.
35. Muñoz-Mármol AM, Sanz C, Tapia G, et al. MYC status determination in aggressive B-cell lymphoma: the impact of FISH probe selection. *Histopathology*. 2013;63:418–424.
36. Cubedo E, Gentles AJ, Huang C, et al. Identification of LMO2 transcriptome and interactome in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 2012;119:5478–5491.
37. Prendergast GC, Ziff EB. Methylation-sensitive sequence-specific DNA binding by the c-Myc basic region. *Science*. 1991;251:186–189.
38. Seitz V, Butzhammer P, Hirsch B, et al. Deep sequencing of MYC DNA-binding sites in Burkitt lymphoma. *PLoS One*. 2011;6:e26837.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary Table 1. Mean, standard deviation (SD) and number of cases (*N*) of *LMO2* expression in cases included in Hummel et al GEP study¹² according to *MYC* gene status

LMO2	MYC non-rearranged (N)	MYC simple (N)	MYC complex (N)	p-value*
Pathology diagnosis				
BL	-	7,35 SD±0.30 (6)	7,21 (1)	-
Atypical BL	9,25 SD±1.42 (5)	7.20 SD±0.18 (15)	7,80 SD±0.74 (3)	<0.001
Aggressive B-NHL	9.48 SD±1.18 (14)	7.24 SD±0.34 (4)	-	0.002
DLBCL	9.34 SD±1.44 (122)	7.41 SD±0.43 (10)	8.37 SD±1.28 (29)	<0.001
Cell of origin				
GCB	10.15 SD±1.24 (57)	7,31 SD±0.27 (9)	8,71 SD±1.36 (20)	<0.001
ABC	8.38 SD±1.06 (45)	8,05 SD±0.46 (2)	7,71 SD±0.63 (8)	0.095
Unclassified	9.32 SD±1.28 (34)	7,10 SD±0.23 (3)	6,92 (1)	<0.001
Molecular Burkitt profile				
Non-mBL	9.43 SD±1.38 (115)	-	8,81 SD±1.43 (9)	0.198
Intermediate	9,11 SD±1.51 (22)	7,69 SD±0.39 (6)	8,19 SD±1.21 (19)	0.009
mBL	8.34 SD±1.51 (4)	7,21 SD±0.22 (29)	7.66 SD±0.62 (5)	0.001

p-value indicates the significance of the T-tests of *MYC* non-rearranged vs. *MYC* rearranged cases

Supplementary Table 2. Incidence of LMO2 and MYC protein expression and the presence of *MYC* gene alterations in 191 LBCL

	<i>MYC</i>	LMO2+	LMO2-	MYC+	MYC-
All cases <i>P</i> <0.004 (<i>N</i> =191)	N	65/123 (53%)	58/123 (47%)	33/123 (27%)	90/123 (73%)
	R	2/21 (10%)	19/21 (90%)	16/21 (76%)	5/21 (24%)
	G	22/40 (55%)	18/40 (45%)	9/40 (22.5%)	31/40 (77.5%)
	A	3/7 (43%)	4/7 (57%)	0/7	7/7 (100%)
CD10+ <i>P</i> <0.001 (<i>N</i> =56)	N	27/32 (84%)	5/32 (16%)	12/32 (37.5%)	20/32 (62.5%)
	R	1/15 (7%)	14/15 (93%)	11/15 (73%)	4/15 (27%)
	G	8/8 (100%)	0/8	2/8 (25%)	6/8 (75%)
	A	1/1 (100%)	0/1	0	1/1 (100%)
CD10- <i>P</i> =0.532 (<i>N</i> =135)	N	38/91 (42%)	53/91 (58%)	21/91 (23%)	70/91 (77%)
	R	1/6 (17%)	5/6 (83%)	5/6 (83%)	1/6 (17%)
	G	14/32 (44%)	18/32 (56%)	7/32 (22%)	25/32 (78%)
	A	2/6 (33%)	4/6 (67%)	0/6	6/6 (100%)

N, *MYC* non-rearranged; R, *MYC* rearranged; G, gains of *MYC*; A, *MYC* amplification

Supplementary Table 3. Statistic measures of the performance of LMO2 and MYC compared with the presence of *MYC* gene rearrangements as gold standard in 191 LBLCL

	All cases (N=191)		CD10+ (N=56)		CD10- (N=135)	
	LMO2-	MYC+	LMO2-	MYC+	LMO2-	MYC+
Sensitivity	90	76	93	73	83	83
Specificity	89	75	88	66	42	78
PPV	19	28	74	44	6	15
NPV	98	96	97	87	98	99
Accuracy	57	75	89	68	44	78
Positive likelihood ratio	8.18	3.04	7.75	2.14	1.43	3.77
Negative likelihood ratio	0.11	0.32	0.07	0.40	0.4	0.21

CD10+, LBLCL with CD10 expression; CD10-, LBLCL without CD10 expression; LMO2-, LBLCL without LMO2 expression; MYC+, LBLCL with MYC protein expression; PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value

3.2 Segon treball:

Clinical interest of LMO2 testing for the diagnosis of aggressive large B-cell lymphomas

Ivonne Vazquez, Natalia Papaleo, Eugenia Garcia, Marta Salido, Antonio Salar, Silvia Hernandez, Xavier Calvo i Luis Colomo.

Cancers 2020; 12: 884

DOI:10.3390/cancers12040884

RESUM

En aquest treball es confirmen els resultats de l'estudi prèviament publicat i afegim dades que puguin explicar la relació entre LMO2 i *MYC*. Tanmateix aportem troballes de supervivència.

Per aquest estudi es van analitzar dos sèries de casos diagnosticats entre el 2000 i el 2019. La primera d'ella incloïa 365 casos de LBCL corresponents a 351 pacients (28 BL, 230 DLBCL, 30 HGBCL-DH/TH, 8 HGBCL-NOS i 43 DLBCL transformats d'un limfoma de baix grau [tDLBCL; 39 FL transformats, 2 MZL transformats, 1 LPL transformat] i 26 FL grau 3A). Aquests casos es van estudiar de manera prospectiva en WTS (si van ser valorats després del 2014) o retrospectiva, aquests tant en WTS com TMA. Per l'estudi de supervivència es van analitzar les dades de 155 pacients.





A més de l'estudi immunofenòtipic i de FISH de les mostres, (*MYC*, *BCL2*, *BCL6*) en 8 casos dels que es disposava de material congelat, es va realitzar una anàlisi quantitativa d'expressió de mRNA de LMO2 i *MYC* mitjançant tècniques de reacció en cadena de la polimerasa en temps real (qPCR).

Els resultats confirmen les dades de l'estudi previ i demostren la utilitat de la determinació de LMO2 clon 1A9-1 per a la detecció de translocacions del gen *MYC*. Així, la pèrdua de l'expressió proteica de LMO2 presenta un PPV, valor predictiu negatiu (NPV) i LR semblants a *MYC* per a la detecció de *MYC*-R. Aquests valors milloren en els casos CD10⁺, on aquesta pèrdua d'expressió detecta millor els *MYC*-R que l'expressió de *MYC*. En quant a les dades de supervivència, la pèrdua d'expressió de LMO2 s'associava a una menor PFS als 5 anys (5a-PFS) i a menor OS als 5 anys (5a-OS).

De l'anàlisi quantitativa de mRNA MYC/LMO2 s'observa que en els casos amb una relació baixa presenten una major OS. Una dada interessant és que aquesta major OS també la vam detectar en els casos que vam anomenar dissociats: presència de MYC-R i LMO2⁺ (MYC-R/LMO2⁺).

Article

Clinical Interest of LMO2 Testing for the Diagnosis of Aggressive Large B-Cell Lymphomas

Ivonne Vazquez ¹, Natalia Papaleo ¹, Eugenia Garcia ², Marta Salido ¹ , Antonio Salar ³ ,
Silvia Hernandez ⁴, Xavier Calvo ¹  and Luis Colomo ^{1,4,*} 

¹ Department of Pathology, Hematopathology Section, Hospital del Mar, Institute of Investigacions Mediques-IMIM, Universitat Autònoma de Barcelona, 08003 Barcelona, Spain; ivazquez@psmar.cat (I.V.); npapaleo@psmar.cat (N.P.); msalido@psmar.cat (M.S.); xcalvo@psmar.cat (X.C.)

² Department of Pathology-IdiPAZ, Hospital Universitario La Paz, 28046 Madrid, Spain; euge17@yahoo.com

³ Department of Hematology, Hospital del Mar, Institute of Investigacions Mediques-IMIM, Universitat Autònoma de Barcelona, 08003 Barcelona, Spain; Asalar@psmar.cat

⁴ Department of Health and Experimental Sciences, Universitat Pompeu Fabra, 08003 Barcelona, Spain; silvia.hernandez@upf.edu

* Correspondence: lcolomo@psmar.cat; Tel.: +34-93-248-32-61

Received: 1 March 2020; Accepted: 4 April 2020; Published: 5 April 2020



Abstract: *MYC* rearrangements usually confer aggressive biological behavior to large B-cell lymphomas. In this study, we aimed to evaluate the relevance of LMO2 detection to the clinical approach to these tumors. First, the ability of LMO2 loss of expression to recognize the presence of *MYC* rearrangements was evaluated. A series of 365 samples obtained from 351 patients, including 28 Burkitt lymphoma, 230 diffuse large B-cell lymphoma, 30 high-grade B-cell lymphoma with *MYC* and *BCL2/BCL6* rearrangements, eight high-grade B-cell lymphoma-NOS, 43 transformed diffuse large B-cell lymphoma, and 26 high-grade follicular lymphomas was analyzed. Among the CD10-positive tumors prospectively analyzed in whole tissue sections, LMO2 negative expression obtained values of 88% sensitivity, 94% specificity, and 93% accuracy, proving the utility of LMO2 to screen *MYC* rearrangements. In addition, survival analyses were performed in a series of 155 patients. As per univariate analyses, the prognosis relevance of LMO2 was as useful as that of the diagnostic categories, *MYC* rearrangements, and *MYC* immunohistochemistry. Multivariate models revealed that both LMO2 (hazard ratio 0.51 $p = 0.02$) and IPI (hazard ratio 1.67 $p < 0.005$) were independent variables predicting overall survival. Finally, *MYC* and *LMO2* mRNA expression were analyzed in a small group of cases. Taken together, these findings show the interest of LMO2 testing in large B-cell lymphomas.

Keywords: *MYC* rearrangement; LMO2; large B-cell lymphoma; immunohistochemistry

1. Introduction

MYC protein belongs to the family of *MYC* transcription factors, that in humans includes N-*MYC* and L-*MYC* [1,2]. They share similar structures and functions but have distinct targets and different expression patterns. *MYC* regulates multiple pathways orchestrating a broad spectrum of genes involved in the regulation of the cell cycle, DNA replication and cell division, cell growth, metabolism, protein biosynthesis, and differentiation. Additionally, *MYC* may cause genomic instability and is involved in the induction of apoptosis controlling *BCL-2* protein family members and the p53 tumor suppressor pathway [2,3]. DNA damage caused by *MYC* overexpression has been associated with telomere aggregation and chromosome remodeling, resulting in loss of chromosomal integrity and therefore facilitating chromosome rearrangements. Moreover, the overexpression of *MYC* induces sustained DNA damage response and delays double-strand breaks DNA repair [4,5].

MYC is commonly dysregulated in aggressive B-cell lymphomas by gene rearrangements, amplifications or mutations. *MYC* rearrangements occur in 5–15% of diffuse large B-cell lymphomas (DLBCL), 20–35% of high-grade B-cell lymphoma, NOS (HGBL-NOS), and 90% of Burkitt lymphoma (BL). Moreover, the presence of such genetic alteration is a defining criterion of the HGBL category with rearrangements of *MYC* and *BCL2* and/or *BCL6* (HGBL-DH/TH) [6]. Thus, the identification of this specific gene alteration is of relevance for the diagnosis and prognosis of most of these entities. The best approach to identify *MYC* rearrangements is not determined yet. In clinical practice, fluorescence in situ hybridization (FISH) and classic G-banding cytogenetics are the most commonly used techniques to detect chromosomal alterations. Metaphase karyotyping requires fresh tissue and cell cultures with dividing cells, which are often neither feasible nor available in laboratories. In addition, this technique may miss some *MYC* cryptic rearrangements identified by FISH [7]. Interphase FISH using break-apart probes has become the most common approach used to identify *MYC* rearrangements. However, some studies have shown that this approach may not recognize 4–10% of cases with *MYC* rearrangements, and those cases could just be detected using dual fusion probes [8,9]. Cryptic rearrangements of *MYC* have been recently identified in cases of DLBCL with unfavorable prognosis. Those cases shared similar gene expression profile like HGBL-DH/TH and were not recognized by conventional FISH methods [10]. Thus, the global incidence of *MYC* rearrangements in large B-cell lymphomas (LBCL) being low, it is necessary to clarify whether FISH or other methods have to be applied to all LBCL or just in selected cases. Furthermore, provided such approaches cannot be afforded by all laboratories, the research of useful surrogate markers is required to screen *MYC* rearrangements.

The *LMO2* (hematopoietic transcription factor LIM domain only 2) gene was initially described as a recurrent chromosomal translocation partner of the TCR gene in a subset of patients with T-cell acute lymphoblastic leukemia. With the development of gene expression profile technology, *LMO2* arose as an important gene defining the germinal center B-cell (GCB) molecular subgroup of DLBCL, as well as a relevant prognostic marker in DLBCL [11–13]. Recent studies have shown that *LMO2* protein expression in DLBCL induces genomic instability [14,15]. We previously observed that *LMO2* gene expression was frequently downregulated in cases with *MYC* rearrangements and identified that *LMO2* loss of protein expression captured better than *MYC* expression most of those cases [16]. In this study we corroborate the clinical utility of our previous observations adding new data recording the relationship between *LMO2* and *MYC*.

2. Results

2.1. *MYC* Protein Expression and Gene Rearrangements in Aggressive B-Cell Lymphomas

We analyzed a series of 365 samples from 351 patients with LBCL including 28 cases diagnosed of BL, 230 DLBCL, 30 HGBL-DH/TH, eight HGBL-NOS, 43 transformed low-grade lymphomas into DLBCL (tDLBCL; 39 transformed follicular lymphomas, three transformed marginal zone lymphomas, and one transformed lymphoplasmacytic lymphoma) and 26 grade 3A follicular lymphomas (FL), diagnosed according to WHO criteria [6].

Table 1 shows clinical features of the patients, and immunohistochemical and genetic alterations of cases with available data. The incidence of the most common markers such as CD10, BCL6, and MUM1, detected by immunohistochemistry (IHC), was similar to a previous published series [17,18]. Among 221 DLBCL with available information, 94 (42%) cases had a GCB-like IHC profile, and 127 were non-GCB following the Hans algorithm [19]. Twenty-seven out of 30 (90%) HGBL-DH/TH, and 7/8 (88%) HGBL-NOS could be classified as GCB-like following the same approach.

Table 1. Clinical and immunohistochemical features, and MYC gene alterations detected by fluorescence in situ hybridization (FISH) in 365 cases of large B-cell lymphomas (LBCL).

Clinical Features	BL	FL g3A	tDLBCL	DLBCL	HGBL-DH/TH	HGBL-NOS
Number of cases	28	26	43	230	30	8
Median age *	30 (2–56)	61 (36–89)	64 (40–82)	66 (21–97)	67 (39–94)	63 (42–89)
Gender (male/female) *	15/13	16/9	20/19	138/84	19/10	3/5
Primary extranodal	20/28 (71%)	5/26 (19%)	11/43 (26%)	135/230 (59%)	18/30 (60%)	4/8 (50%)
IHC						
CD10+	28/28 (96%)	23/26 (88%)	31/43 (72%)	83/227 (37%)	25/30 (83%)	7/8 (87%)
BCL6+	25/25 (100%)	25/25 (100%)	41/43 (95%)	198/222 (89%)	27/30 (97%)	8/8 (100%)
MUM1/IRF4+	7/15 (47%)	1/22 (4%)	19/40 (44%)	173/218 (79%)	8/29 (28%)	3/8 (37%)
BCL2+	2/28 (7%)	19/26 (73%)	38/43 (88%)	173/214 (81%)	27/29 (93%)	3/8 (37%)
MYC+	15/20 (75%)	0/21 (0%)	13/40 (32%)	69/220 (31%)	27/28 (96%)	7/8 (87%)
LMO2+	0/21 (0%)	24/24 (100%)	28/40 (70%)	123/196 (63%)	8/28 (27%)	2/8 (25%)
FISH						
MYC-N	0/28 (0%)	21/26 (81%)	21/43 (49%)	162/230 (70%)	0/30 (0%)	1/8 (25%)
MYC-R	28/28 (100%)	0/26 (0%)	11/43 (26%)	15/230 (6%)	30/30 (0%)	7/8 (87%)
MYC+IG/MYC-R	7/7 (100%)	0/0 (0%)	3/8 (37%)	8/9 (89%)	12/15 (80%)	6/6 (100%)
MYC-G	0/28 (0%)	5/26 (19%)	10/43 (23%)	49/230 (22%)	0/30 (0%)	0/8 (0%)
MYC-A	0/28 (0%)	0/26 (0%)	1/43 (2%)	4/230 (2%)	0/30 (0%)	0/8 (0%)
BCL2-R	0/9 (0%)	15/26 (58%)	25/41 (61%)	30/193 (15%)	25/29 (86%)	0/8 (0%)
BCL6-R	0/9 (0%)	3/23 (13%)	13/39 (33%)	49/173 (28%)	12/28 (43%)	0/8 (0%)

* Based on 351 patients; IHC, immunohistochemistry; MYC-N, MYC non-rearranged; MYC-R, MYC rearranged; MYC+IG, MYC rearranged with immunoglobulin heavy or light chains; MYC-G, MYC gained; MYC-A, MYC amplification; BCL2-R, BCL2 rearranged; BCL6-R, BCL6 rearranged.

MYC protein expression over 40% of neoplastic cells was present in 27/28 (96%) HGBL-DH/TH and 15/20 (75%) BL, all of them carrying MYC rearrangements, and 7/8 (87%) HGBL-NOS. In the latter group, 6/7 MYC rearranged cases expressed MYC as well as one case lacking MYC rearrangement. Interestingly, one patient that presented with pelvic mass and peripheral blood involvement at diagnosis, classified in the group of HGBL-NOS carrying MYC rearrangement, acquired an additional t(18;22) at relapse, being therefore classifiable as HGBL-DH/TH.

The group of DLBCL included 69/220 (31%) MYC positive cases detected by IHC. Among the 69 MYC positive cases, 12 (17%) carried MYC rearrangements, whereas only two MYC negative cases out of 151 (1%) were MYC rearranged ($p < 0.001$). In tDLBCL, MYC was expressed in 13/40 (32%) cases. Among them, 10/13 (77%) were MYC rearranged cases, and only 1/27 (4%) MYC negative cases was MYC rearranged ($p < 0.001$). The high incidence of MYC rearrangements in this group can be attributed to the main definition of the category HGBL-DH/TH included the WHO classification, that excludes cases of proven follicular lymphoma. Among tDLBCL with FL and MYC and BCL2/BCL6 rearrangements, five patients had previous history of FL, and four had simultaneous DLBCL and FL in the same biopsy. In three of four cases included in the latter group, MYC was expressed in both components, although MYC rearrangement was identified only in the DLBCL component. Of note, in none of grade 3A FL cases with available information MYC was expressed or rearranged.

In 45 cases we could determine the partner of MYC rearrangements. Table 1 shows 36 cases MYC/IG-rearranged (34 IGH, one HGBL-DH/TH, and 1BL were IG-lambda, the latter cases identified by conventional karyotyping) and nine cases MYC/non-IG. Five out of eight (62%) tDLBCL and 3/15 (20%) HGBL-DH/TH were MYC/non-IG ($p = 0.013$).

2.2. LMO2 Is Downregulated in MYC-Rearranged Aggressive B-Cell Lymphomas

LMO2 protein was negative in 21 BL studied, had low incidence of expression in the categories associated with MYC rearrangements (HGBL-DH/TH and HGBL-NOS, 27% and 25%, respectively), and was frequently expressed in FL, tDLBCL, and DLBCL (100%, 70%, and 63%, respectively). The statistical analyses showed significant statistical association between the loss of expression of LMO2 and the presence of MYC rearrangements in the whole series of cases ($p < 0.005$). To avoid

the potential bias caused by an overrepresentation of CD10-positive cases, BL and FL grade 3A were excluded of the analyses and significant results were obtained in 272 analyzed cases ($p < 0.005$).

To assess whether LMO2 could be a useful marker to screen *MYC* rearrangements, prospective and retrospective cases were studied. For this purpose, in prospective cases all markers were evaluated in whole tissue sections (WTS), as during the work up of cases. To analyze retrospective cases, WTS and or tissue microarrays (TMAs) were used. The statistical analyses were carried out according to these two groups. The statistical analysis showed significant correlations between LMO2 expression and *MYC* rearrangements in both prospective and retrospective groups ($p < 0.005$ for both groups). Table 2 shows the statistic measures of the performance of LMO2 and *MYC* compared with the presence of *MYC* gene rearrangements as gold standard.

Table 2. Statistic measures of the performance of LMO2 and *MYC* compared with the presence of *MYC* gene rearrangements as gold standard in LBCL.

Measure	All Series		Prospective Series		All Series CD10+		CD10+ Prospective Series	
	LMO2 (n = 317)	MYC (n = 337)	LMO2 (n = 210)	MYC (n = 209)	LMO2 (n = 175)	MYC (n = 177)	LMO2 (n = 110)	MYC (n = 107)
Sensitivity (%)	80/87		86/86		79/84		88/84	
Specificity (%)	71/76		75/76		89/78		94/80	
PPV (%)	48/53		41/42		81/69		81/57	
NPV (%)	91/95		96/96		88/91		96/94	
Positive LR	2.79/3.69		3.49/3.64		7.19/3.89		14.96/4.31	
Negative LR	0.28/0.16		0.18/0.18		0.24/0.18		0.13/0.2	
Accuracy	74/79		77/78		85/81		93/81	

PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value; LR, likelihood ratio.

The results are very similar to those obtained in our previous study, that included a different series of patients [16]. Thus, LMO2 protein is a marker with similar sensitivity, specificity, accuracy, positive predictive value (PPV), negative predictive value (NPV), and likelihood ratios (LR) as *MYC* protein, particularly in those studied prospectively. Moreover, in CD10-positive cases the loss of LMO2 expression captures better the presence of *MYC* rearrangements than *MYC* protein expression, since they occur more frequently in GCB-derived aggressive large B-cell lymphomas (Table 2 and Table S1). When we used the Hans algorithm to classify the cell of origin instead of CD10 expression, we observed lower specificity (77% vs. 94%), PPV (56% vs. 81%), accuracy (80% vs. 93%), and positive LR (3.88 vs. 14.96) in GCB-like cases, compared with CD10-positive cases. The sensitivity was 88% for both approaches, and the NPV and negative LR were 95% vs. 96%, and 0.16 vs 0.13, respectively.

2.3. LMO2 Captures the Impact of Known Prognostic Factors in Aggressive LBCLs

We performed survival analyses assessing the clinical impact of LMO2 in a series of 155 LBCL patients with available clinical information including: seven FL g3A, 22 tDLBCL, 105 DLBCL, 20 HGBL-DH/TH, and four HGBL-NOS.

Survival features are detailed in Table 3 and plotted in Figure 1. According the diagnostic categories, the 5-year progression-free survival (PFS) was 25% for tDLBCL and HGBL-NOS, (median PFS 25.05 and 11.19 months, respectively), 55% for DLBCL, and 20% for HGBL-DH/TH ($p = 0.009$). In addition, the 5-year PFS was significantly lower for the presence of *MYC* rearrangement (23% vs. 51%, $p = 0.001$), *MYC* IHC expression (32% vs. 51%, $p = 0.001$), and LMO2 loss of expression (33% vs. 53%, $p = 0.05$).

Table 3. Clinical features and survival of patients with aggressive LBCL.

Clinical Features	All Cases (n = 155)	CD10+/LMO2- (n = 78)
Median age	67 (27–89)	67 (38–89)
Gender (male/female)	89/66	41/37
Diagnosis		
FL g3A	7/155 (4.5%)	3/78 (4%)
tDLBCL	22/155 (14%)	17/78 (22%)
DLBCL	105/155 (68%)	42/78 (54%)
HGBL, NOS	4/155 (2.5%)	4/78 (5%)
HGBL-DH/TH	17/155 (11%)	12/78 (15%)
Stage III/IV	85/151 (88%)	43/78 (56%)
IPI high (3–4)	69/144 (88%)	32/70 (41%)
Complete response	102/155 (66%)	49/78 (63%)
5y PFS/OS		
FL g3A	NR/NR	NR/NR
tDLBCL	25/76	25/76
DLBCL	55/68	48/70
HGBL-NOS	25/50	25/50
HGBL-DH/TH	20/25	25/22
MYC-rearranged	23/38	23/39
MYC+ IHC	32/47	25 */48
LMO2- IHC	33/46	27 **/40

p < 0.05 for all survival results except * *p* = 0.067 and ** *p* = 0.251.

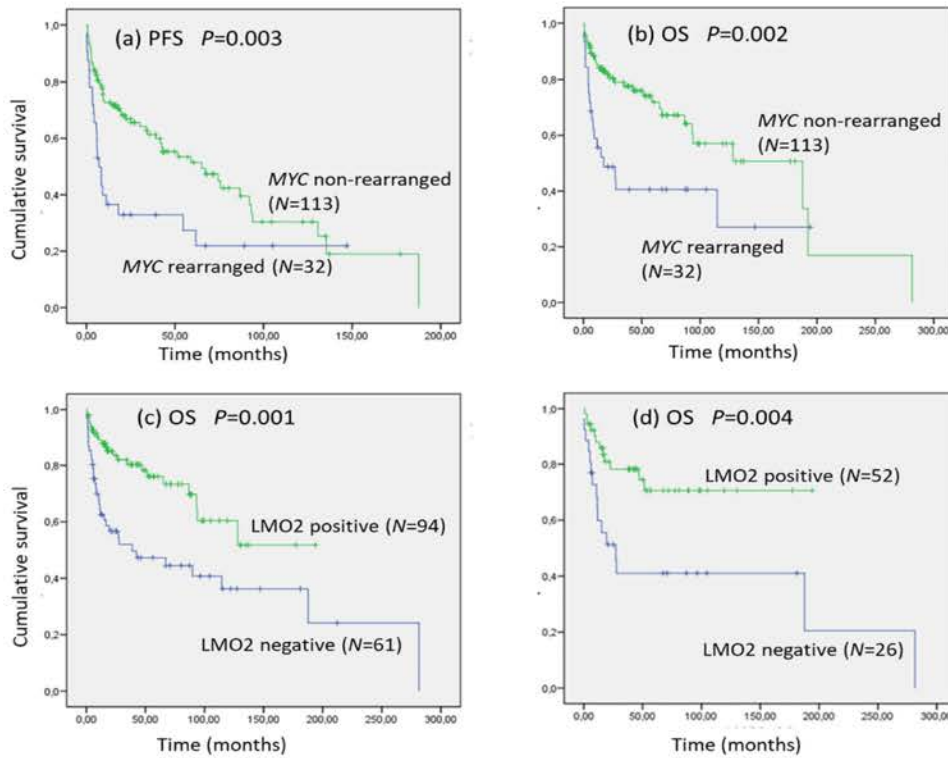


Figure 1. Progression-free survival (PFS) (a) and overall survival (OS) (b) of MYC rearrangements in 155 LBCL. OS of LMO2 expression in 155 LBCL (c) and 78 CD10-positive LBCL (d).

The 5-year overall survival (OS) according the diagnostic categories was 76% for tDLBCL, 68% for DLBCL, 50% for HGBL-NOS, and 25% for HGBL-DH/TH ($p = 0.003$). Moreover, the 5-year OS was significantly shorter for the presence of *MYC* rearrangement (38% vs. 72%, $p = 0.002$), *MYC* protein expression (47% vs. 74%, $p = 0.001$), and *LMO2* loss of expression (46% vs. 76%, $p = 0.001$). All these significant results were obtained independently of the administered treatment and were also significant in 112 patients treated with curative intention (Table S2). As *LMO2* captures better the presence of *MYC* rearrangements in CD10-positive LBCLs, we performed the survival analyses in this group, obtaining similar results as in the whole series of cases (Table 3).

Finally, in a Cox regression survival analysis including the International Prognostic Index (IPI) and *LMO2* for 140 cases, IPI (HR: 1.67 $p < 0.005$) and *LMO2* (HR: 0.51 $p = 0.02$) were the most important variables to predict OS. Moreover, the models including *MYC* IHC, *MYC* rearrangements, and diagnostic category did not add predictive accuracy to IPI score (HR: 1.45 $p = 0.32$; HR: 0.95 $p = 0.89$; HR: 1.28 $p = 0.27$, respectively). These results were similar considering CD10-positive cases in 45 patients treated with curative intention (IPI HR: 2.46 $p = 0.01$).

2.4. Interest of *MYC/LMO2* mRNA Expression and *MYC/LMO2* Dissociated Cases

The mRNA expression of *MYC* and *LMO2* was studied by quantitative real-time PCR (qPCR) in eight cases. The results are shown in Figure 2 and Table S3. Cases #1 to #4 were HGBL-DH/TH, #5 and #6 tDLBCL with *MYC* rearrangements (both FL), #7 a tDLBCL with *MYC* amplification, and #8 DLBCL with *MYC* gains and *BCL2* rearrangement. To evaluate the relationship between the expression of both genes a ratio *MYC:LMO2* was obtained for each case. Cases #1 to #3 had the highest ratios (range 29.7–803.4) and patients had an OS between 1 and 12 months. Conversely, patients with low ratios *MYC:LMO2* (range 2.5–9.3) were long survivors and all are still alive (range 87–194 months) even carrying double or triple rearrangements of *MYC* and *BCL2/BCL6*. These preliminary results raise the interest of the detection of *MYC* and *LMO2* mRNA expression and warrant additional studies.

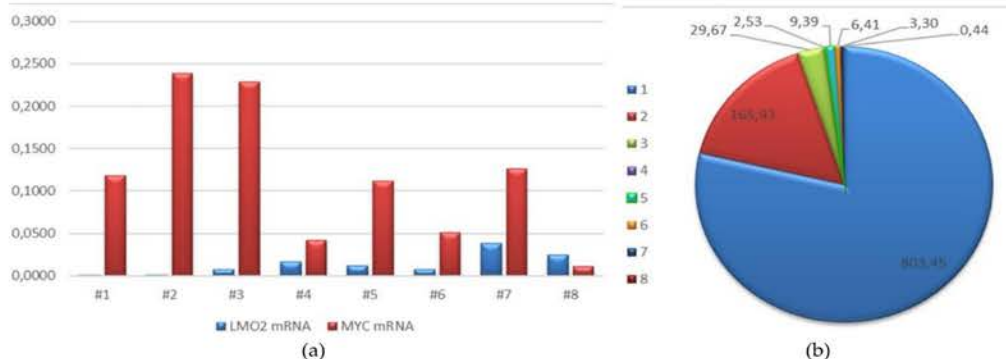


Figure 2. *MYC* and *LMO2* mRNA expression. (a) *LMO2* and *MYC* mRNA by quantitative real-time PCR (qPCR) in HGBL-DH/TH (cases #1 to #4), tDLBCL with *MYC* rearranged, (#5, #6), tDLBCL with *MYC* amplified (#7), and DLBCL with *MYC* gained (#8); (b) *MYC* mRNA:*LMO2* mRNA in same cases.

CD10 identifies GCB-derived cases and *LMO2* is frequently downregulated in this group when *MYC* is rearranged. However, in our previous study we found CD10-positive LBCL cases with *MYC* rearrangement and *LMO2* expression (*MYC*^{r+}/*LMO2*⁺), that we defined as “dissociated” cases (DC). Such group did not present relevant clinicopathological differences compared with non-DC cases with *MYC*^{r+}/*LMO2*⁻ profile [16]. In the present study we wanted to know the clinical behavior of DC. Eight samples from eight patients met this criterion: three tDLBCL (all transformed FL) and five HGBL-DH/TH. Clinical information was available in eight DC and 26 non-DC. Among 31 patients receiving treatment, the 5-year OS was 67% for DC cases and 21% for non-DC ($p = 0.04$) (Figure 3).

Among 23 patients receiving treatment with curative intention, 5/6 (83%) *MYC*^{Cr+}/*LMO2*⁺ achieved complete remission (CR) compared with 6/17 (35%) *MYC*^{Cr+}/*LMO2*⁻ patients ($p = 0.04$). The 5-year OS in this group was 60% for DC cases and 35% for non-DC ($p = 0.2$).

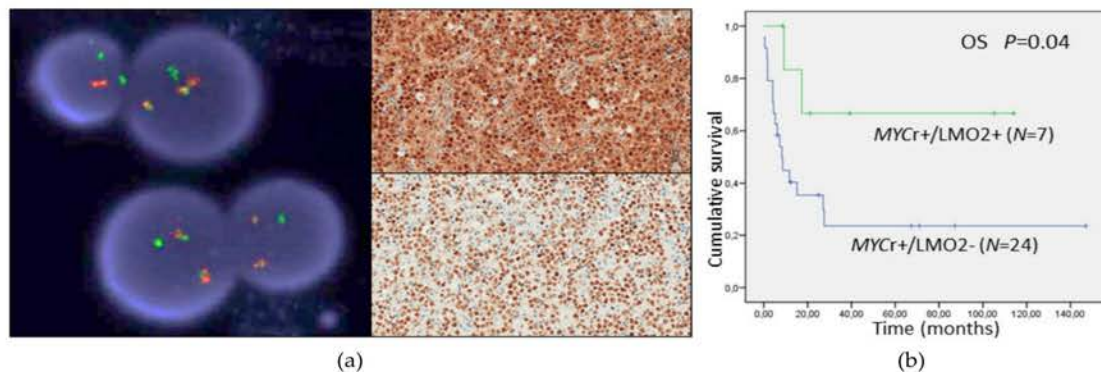


Figure 3. (a) An example of dissociated case, with *MYC* rearranged and high expression of *LMO2* protein (up) and *MYC* protein (down) (case #5 from Figure 2); (b) OS comparing *MYC*^{Cr+}/*LMO2*⁺ and *MYC*^{Cr+}/*LMO2*⁻ cases.

3. Discussion

In the present study we aimed to evaluate the clinical utility of *LMO2* protein expression for the diagnostic approach of LBCL. First, we assessed the ability of *LMO2* loss of expression to capture the presence of *MYC* rearrangements. Thus, we used a similar approach to evaluate the reproducibility of the results obtained in our previous study, based on 330 patients. In the previous survey, we observed a value of 87% for the sensitivity, specificity, and accuracy, respectively, for the detection of *MYC* rearrangements when *LMO2* was downregulated in CD10-positive tumors [16]. Now, we analyzed a series of 365 cases, obtaining values of 88%, 94%, and 93% for the same measures, respectively, reinforcing our previous observations. In the present study, we also analyzed our results in prospective and retrospective cases. Therefore, we compared the immunohistochemical results in WTS in the former group, with those obtained in WTS and TMAs in the latter. Better results were obtained in the prospective group, indicating the benefit of including *LMO2* as diagnostic marker in the workflow of LBCL. Thus, these intriguing results indicate that *LMO2* may be a useful marker to screen *MYC* rearrangements in aggressive LBCL, particularly in CD10-positive cases. Further studies should evaluate whether this approach may be useful to screen cases carrying FISH-cryptic rearrangements of *MYC*.

Another objective was to evaluate whether *LMO2* behaves as several proven prognostic factors in LBCL, such as the classification based on clinicopathological diagnostic entities and categories, the clinical IPI, the presence of *MYC* rearrangements, and *MYC* protein expression detected by immunohistochemistry. The survival analyses performed for all these variables offered significant results and indicates that *LMO2* captures the significant prognostic impact of these proven variables as well. Several published studies have shown the prognostic impact of *LMO2* at different levels. Gene expression profiling (GEP) studies identified *LMO2* as one of the relevant genes defining the GCB-like signature in DLBCL. As known, this group associates with a favorable outcome both in both pre- and Rituximab era [11,20,21]. To ease the translation to clinics of GEP analyses, selected panels including reduced number of markers were defined, and some studies demonstrated the prognostic impact of *LMO2* gene expression in this setting [12,22]. At the protein level, *LMO2* was included in the Tally algorithm as one of the proteins defining the GCB-like immunohistochemical profile [23]. As a single prognostic marker, *LMO2* protein expression had also shown prognostic impact on DLBCL [13]. In our study, we obtained an independent prognostic impact for *LMO2* in the multivariate analyses,

as observed in the study of Natkunam et al., enhancing the interest in studying LMO2 protein by immunohistochemistry in LBCL [13].

In addition, some suggestive ideas arise from the present study, such as the interest of testing MYC expression in FL, and the differences in the survival of cases carrying DH-TH. Thus, MYC expression was observed in three of four cases of composite FL and DLBCL carrying MYC rearrangements, whereas MYC protein expression was negative in all grade 3A FL studied. As MYC genetic alterations only appeared in composite FL and DLBCL, it seems to make sense to explore MYC protein expression in this clinical situation to screen MYC rearrangements. On the other hand, we observed remarkable differences in survival of patients with LBCL with low MYC:LMO2 ratios, compared with cases with higher ratio. Of note, two of three long survivors corresponded to tDLBCL from FL. Miyaoka et al. compared the clinicopathological features and genomic complexity of FL carrying MYC rearrangements (DH-FL) with HGBL-DH/TH [24]. The biological behavior was more favorable for patients with DH-FL, and the genomic complexity was lower in such cases. Favorable outcomes of DH-FL were also observed in other studies in patients treated with conventional or intensive schemes [25–27]. Recent studies have defined the molecular high-grade B-cell lymphoma profile (MGH) by gene expression and mutational analysis [28,29]. These studies identified cases that did not carry MYC rearrangements and behaved aggressively. The authors also described the contrary situation, identifying HGBL-DH/TH with similar behavior as GCB-DBCL. MYC mRNA levels play a remarkable role in MGH profile, suggesting the validity of our preliminary results assessing MYC:LMO2 ratios.

LMO2 appears as a helpful marker to identify BL, and it is usually negative in this entity, as observed in the present and our previous study [16]. Therefore, these results improve MYC IHC for the characterization of BL, which sometimes may lack MYC protein expression even carrying MYC translocations. In our series, 3/30 [16] and 5/20 BL cases lacked MYC expression. Some studies showed that MYC mutations are common in BL and mainly locate in the first 100 aa of the MYC protein. This is the region recognized by MYC clone Y69, and this may explain the absence of MYC protein expression in such cases [30]. Moreover, recent studies suggest that LMO2 also appears to be useful for the differential diagnosis of BL and the provisional category of Burkitt-like lymphoma with 11q aberration. Two independent studies characterizing Burkitt-like lymphoma with 11q aberration, noted LMO2 protein expression in 7/10 (70%) and 5/11 (46%) cases [31,32]. An additional study including 75 BL observed absent expression of LMO2 in 74 (99%) cases, whereas three out of three Burkitt-like lymphomas with 11q aberration were positive [33]. Taken together, these results support our observations regarding the low levels of protein expression in BL and its correlations with MYC rearrangements.

Finally, recent studies associate LMO2 protein expression with genomic instability in DLBCL. Cubedo et al. showed a link between LMO2 gene overexpression and the expression of genes related to chromosomal assembly and segregation in mitosis, to DNA damage, and response to cellular stress, resulting in genomic instability [14]. Recently, Parvin et al. demonstrated that DLBCL expressing LMO2 protein are functionally deficient in homologous recombination (HR)-mediated double strand breaks (DSB) DNA repair [15]. In this study, the authors identified the impairment of the HR pathway in LMO2 positive tumors and how this alteration sensitized such DLBCL to inhibitors of the preserved pathways. MYC also impairs the mechanisms of DSB repair. As LMO2 expression determines diverse biological behavior in LBCLs, a hypothesis to be assessed might be whether MYC rearranged LBCLs downregulate LMO2 to gain survival advantage.

4. Materials and Methods

4.1. Case Selection

We studied two series of patients diagnosed of LBCL, including BL, grade 3A FL, DLBCL, HGBL-DH/TH, HGBL-NOS, and tDLBCL, diagnosed according to WHO criteria [6]. Primary mediastinal large cell lymphoma, T-cell rich B-cell lymphoma, HHV8-associated lymphoma,

and plasmablastic lymphoma or transformed myeloma were not included in the study. The first series included 365 samples from 351 patients and evaluated the relationship between LMO2 expression and *MYC* rearrangements. Among patients with more than one sample, four patients experienced transformation from FL to DLBCL, and the other patients did not change the first diagnosis during the course of the disease. This series included consultation cases and cases received at our institution for cytogenetic studies. All cases were diagnosed between 2000 and 2019, with the criterion of the availability of adequate histological material. The series used for survival analysis included 155 patients diagnosed and treated at Hospital del Mar. The study was approved by the Ethics Committee of the Hospital del Mar of Barcelona (2017/7481/I). Informed consent to use both clinical data and histological material was obtained in accordance with the Declaration of Helsinki.

4.2. Immunohistochemistry

Cases were classified as prospective and retrospective if diagnosed after or before September 2014. The prospective cohort included 215 cases studied in whole tissue sections (WTS). The retrospective cohort included 150 cases, 34 of them studied using WTS and 116 in TMAs, which included two 1-mm representative cores of each case and were constructed using a tissue arrayer (MTA I; Beecher Instruments Inc, Sun Prairie, WI, USA). Immunohistochemical studies were performed using a panel of monoclonal antibodies reactive in paraffin-embedded tissue sections using a peroxidase-labeled detection system, standard antigen retrieval protocols, and automated immunostainer (Benchmark XT, Ventana, Roche, Tucson, AZ, USA). Standard methods for tissue fixation (10% buffered formalin) and processing were used. The panel of antibodies included common B- and T-cell markers, *BCL2* (clone 124), *CD10* (clone SP67), *BCL6* (clone GI191E-A8), *MUM1/IRF4* (clone MRQ-43), *Ki-67* (clone MIB-1), and *MYC* (clone Y69). The conditions and the evaluation for all these antibodies were the same as previously described and were assessed as previously described, using appropriate internal and external controls [16]. The immunohistochemical study included the identification of the cell of origin (COO) for DLBCL cases by the Hans algorithm [19]. The cutoff for *MYC* immunostaining was 40%, as reported [16,17]. *LMO2* (clone 1A9-1, Ventana-Roche, USA) was incubated for 16 min, after the antigen retrieval with CC1 solution for 16 min and detected by OptiView Universal DAB Detection Kit in an automated immunostainer (Benchmark XT, Ventana, Roche, Tucson, AZ, USA). A cutoff of 30% was assigned for *LMO2*.

4.3. Fluorescence In Situ Hybridization (FISH)

FISH was performed and evaluated as previously described, following the criteria of Ventura [34]. Break-apart probes (BAP) specific for *MYC* (8q24) were applied in all cases included in the study. A dual fusion probe specific for *IGH/MYC/CEP8* was used in 45 cases with *MYC* rearrangement identified with BAP probes. For *BCL2* dual fusion probes *IGH/BCL2* were used, whereas BAP probes were performed for *BCL6*, as previously described, all from Vysis (Abbott Molecular, Des Plaines, IL, USA) [16]. The cut-off values for the interphase FISH analyses were established following the criteria of Ventura, and the criteria for gains and amplifications were the same as reported [18].

4.4. *LMO2* and *MYC* Quantitative mRNA Expression Analysis (qPCR)

Total RNA was extracted from eight frozen lymphoma samples with Ultraspec and the RNeasy Mini kit (Qiagen, Cathsworth, CA, USA) from 8–10 sections of 10 µm. RNA purity and quality were assessed with the Nanodrop® ND-100 spectrophotometer (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE, USA) and the Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent, Santa Clara, CA, USA). cDNA was synthesized using 1 µg of total RNA and Superscript IV Kit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA).

LMO2 and *MYC* mRNA expression were analyzed by quantitative Real-Time PCR (qPCR) in all samples, with the ABI PRISM 7500 Sequence Detection System, using the TaqMan® Gene Expression Assay probe and primer mix (Applied Biosystems, Life Technologies Corporation, Foster City, CA, USA). The assay identification number for *LMO2* and *MYC* were Hs00153473_m1, and Hs00153408_m1,

respectively. The *GAPDH* (4310884E) gene was used as internal control to normalize levels of mRNA expression ($2^{(-\Delta Ct)}$). The samples were run in triplicate, the mean value was calculated, and a ratio between *MYC* and *LMO2* was obtained in each case.

4.5. Statistical Analysis

Data were compared using Chi-square test, unpaired *t*-tests, or nonparametric tests when necessary. *p* values < 0.05 were considered statistically significant for all tests. Accuracy, sensitivity, specificity, and positive and negative predictive values of *LMO2* were calculated for 360 patients with LBCL. Likelihood positive and negative ratios were calculated to evaluate diagnostic accuracy. Standard definitions of complete response, progression-free survival, and overall survival were used, and survival analysis was carried out according to the method described by Kaplan and Meier and the curves compared by the log-rank test. The multivariate analyses for survival were performed using the stepwise proportional hazards model (Cox) as previously described [18].

5. Conclusions

In summary, in this study we show the interest of *LMO2* testing in aggressive LBCL. We confirm the utility of *LMO2* to define the profile of BL and the relevance of *LMO2* as a surrogate marker for the detection on *MYC* rearrangements, particularly among CD10-positive tumors. In addition, we show that *LMO2* captures the prognostic impact of other known markers and show the importance of this marker for the prognosis of these lymphomas. Otherwise, in the study we are recording the interest of *MYC* mRNA detection and the potential interest of *MYC*/*LMO2* profile to delineate the biological behavior of cases carrying *MYC* rearrangements. Finally, a potential relationship between the presence of *MYC* rearrangements, *LMO2* expression, and genomic instability arises from this study.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2072-6694/12/4/884/s1>, Table S1: CD10 versus *MYC* gene status according diagnostic categories in 362 cases of LBCL with available results, Table S2: Five year PFS and OS in 112 patients with aggressive LBCL treated with curative intention; Table S3: Clinicopathological features of patients with *LMO2* and *MYC* mRNA results.

Author Contributions: Conceptualization, I.V. and L.C.; methodology, I.V., N.P., S.H. and L.C.; investigation, I.V., S.H., M.S. and L.C.; resources, I.V., N.P., E.G. and L.C.; data analyses, A.S., X.C. and L.C.; writing—original draft preparation, I.V. and L.C.; writing—review and editing, I.V., S.H., M.S., A.S., X.C. and L.C.; funding acquisition, L.C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by grants Fondo de Investigacion Sanitaria (FIS), Instituto de Salud Carlos III PI17/313 (L.C.) and grant ACCIO-CIDEM RD08-2-0035 (L.C.).

Acknowledgments: The authors want to thank Xenia Riera, Maria Rodriguez-Rivera, and Lola Tobalina for their excellent technical assistance and English editing.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Nie, Z.; Hu, G.; Wei, G.; Cui, K.; Yamane, A.; Resch, W.; Wang, R.; Green, D.R.; Tessarollo, L.; Casellas, R.; et al. c-Myc is a universal amplifier of expressed genes in lymphocytes and embryonic stem cells. *Cell* **2012**, *151*, 68–79. [CrossRef] [PubMed]
- Dang, C. MYC on the path to cancer. *Cell* **2012**, *149*, 22–35. [CrossRef] [PubMed]
- Ott, G.; Rosenwald, A.; Campo, E. Understanding MYC -driven aggressive B-cell lymphomas: Pathogenesis and classification. *Ann. Lymphoma* **2016**, *122*, 575–583.
- Ambrosio, S.; Amente, S.; Napolitano, G.; Di Palo, G.; Lania, L.; Majello, B. MYC impairs resolution of site-specific DNA double-strand breaks repair. *Mutat. Res. Fundam. Mol. Mech. Mutagenesis* **2015**, *774*, 6–13. [CrossRef] [PubMed]
- Louis, S.F.; Vermolen, B.J.; Garini, Y.; Young, I.T.; Guffei, A.; Lichtensztejn, Z.; Kuttler, F.; Chuang, T.C.Y.; Moshir, S.; Mougey, V.; et al. c-Myc induces chromosomal rearrangements through telomere and chromosome remodeling in the interphase nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 9613–9618. [CrossRef] [PubMed]

6. Swerdlow, S.H.; Campo, E.; Pileri, S.; Harris, N.L.; Stein, H.; Siebert, R.; Advani, R.; Ghielmini, M.; Salles, G.; Zelenetz, A.; et al. The 2016 revision of the World Health Organization (WHO) classification of lymphoid neoplasms. *Blood* **2016**, *127*, 2375–2390. [[CrossRef](#)]
7. Landsburg, D.J.; Nasta, S.D.; Svoboda, J.; Morrissette, J.; Schuster, S. “Double-Hit” cytogenetic status may not be predicted by baseline clinicopathological characteristics and is highly associated with overall survival in B cell lymphoma patients. *Br. J. Haematol.* **2014**, *166*, 369–374. [[CrossRef](#)]
8. King, R.L.; McPhail, E.D.; Meyer, R.; Vasmatazis, G.; Pearce, K.; Smadbeck, J.; Ketterling, R.; Smoley, S.; Greipp, P.; Hoppman, N.; et al. False-negative Rates for MYC FISH Probes in B-cell Neoplasms. *Haematologica* **2018**, *104*, e248–e251. [[CrossRef](#)]
9. Moore, E.M.; Aggarwal, N.; Surti, U.; Swerdlow, S.H. Further Exploration of the Complexities of Large B-Cell Lymphomas with MYC Abnormalities and the Importance of a Blastoid Morphology. *Am. J. Surg. Pathol.* **2017**, *41*, 1155–1166. [[CrossRef](#)]
10. Hilton, L.K.; Tang, J.; Ben-Neriah, S.; Alcaide, M.; Jiang, A.; Grande, B.; Rushton, C.; Boyle, M.; Meissner, B.; Scott, D.; et al. The double-hit signature identifies double-hit diffuse large B-cell lymphoma with genetic events cryptic to FISH. *Blood* **2019**, *134*, 1528–1532. [[CrossRef](#)]
11. Rosenwald, A.; Wright, G.; Chan, W.; Connors, J.; Campo, E.; Fisher, R.; Gascoyne, R.; Konrad Muller-Hermelink, H.; Smeland, E.; Giltnane, J.; et al. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *New Engl. J. Med.* **2002**, *346*, 1937–1947. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Lossos, I.S.; Czerwinski, D.K.; Alizadeh, A.; Wechser, M.; Tibshirani, R.; Botstein, D.; Levy, R. Prediction of survival in diffuse large-B-cell lymphoma based on the expression of six genes. *New Engl. J. Med.* **2004**, *350*, 1828–1837. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Natkunam, Y.; Farinha, P.; His, E.; Hans, C.; Tibshirani, R.; Sehn, L.; Connors, J.; Gratzinger, D.; Rosado, M.; Zhao, S.; et al. LMO2 protein expression predicts survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with anthracycline-based chemotherapy with and without rituximab. *J. Clin. Oncol.* **2008**, *26*, 447–454. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Cubedo, E.; Gentles, A.J.; Huang, C.; Natkunam, Y.; Bhatt, S.; Lu, X.; Jiang, X.; Romero-Camarero, I.; Freud, A.; Zhao, S.; et al. Identification of LMO2 transcriptome and interactome in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* **2012**, *119*, 5478–5491. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Parvin, S.; Ramirez-Labrada, A.; Aumann, S.; Lu, X.; Weich, N.; Santiago, G.; Cortizas, E.; Sharabi, E.; Zhang, Y.; Sanchez-Garcia, I.; et al. LMO2 Confers Synthetic Lethality to PARP Inhibition in DLBCL. *Cancer Cell* **2019**, *36*, 237–249.e6. [[CrossRef](#)]
16. Colomo, L.; Vazquez, I.; Papaleo, N.; Espinet, B.; Ferrer, A.; Franco, C.; Comerma, L.; Hernandez, S.; Calvo, X.; Salar, A.; et al. LMO2-negative Expression Predicts the Presence of MYC Translocations in Aggressive B-Cell Lymphomas. *Am. J. Surg. Pathol.* **2017**, *41*, 877–886. [[CrossRef](#)]
17. Horn, H.; Ziepert, M.; Becher, C.; Barth, T.; Bernd, H.; Feller, A.; Klapper, W.; Hummel, M.; Stein, H.; Hansmann, M.; et al. MYC status in concert with BCL2 and BCL6 expression predicts outcome in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* **2013**, *121*, 2253–2263. [[CrossRef](#)]
18. Valera, A.; Lopez-Guillermo, A.; Cardesa-Salzmann, T.; Climent, F.; González-Barca, E.; Mercadal, S.; Espinosa, I.; Novelli, S.; Briones, J.; Mate, J.; et al. MYC protein expression and genetic alterations have prognostic impact in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with immunochemotherapy. *Haematologica* **2013**, *98*, 1554–1562. [[CrossRef](#)]
19. Hans, C.P.; Weisenburger, D.D.; Greiner, T.; Gascoyne, R.; Delabie, J.; Ott, G.; Müller-Hermelink, H.; Campo, E.; Braziel, R.; Jaffe, E.; et al. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood* **2004**, *103*, 275–282. [[CrossRef](#)]
20. Alizadeh, A.A.; Eisen, M.B.; Davis, R.; Ma, C.; Lossos, I.; Rosenwald, A.; Boldrick, J.; Sabet, H.; Tran, T.; Yu, X.; et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* **2000**, *403*, 503–511. [[CrossRef](#)]
21. Lenz, G.; Wright, G.; Dave, S.; Xiao, W.; Powell, J.; Zhao, H.; Xu, W.; Tan, B.; Goldschmidt, N.; Iqbal, J.; et al. Stromal gene signatures in large-B-cell lymphomas. *New Engl. J. Med.* **2008**, *359*, 2313–2323. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

22. Malumbres, R.; Chen, J.; Tibshirani, R.; Johnson, N.; Sehn, L.; Natkunam, Y.; Briones, J.; Advani, R.; Connors, J.; Byrne, G.; et al. Paraffin-based 6-gene model predicts outcome in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with R-CHOP. *Blood* **2008**, *111*, 5509–5514. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Meyer, P.N.; Fu, K.; Greiner, T.; Smith, L.; Delabie, J.; Gascoyne, R.; Ott, G.; Rosenwald, A.; Braziel, R.; Campo, E.; et al. Immunohistochemical methods for predicting cell of origin and survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab. *J. Clin. Oncol.* **2011**, *29*, 200–207. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Miyaoka, M.; Kikuti, Y.Y.; Carreras, J.; Ikoma, H.; Hiraiwa, S.; Ichiki, A.; Kojima, M.; Ando, K.; Yokose, T.; Sakai, R.; et al. Clinicopathological and genomic analysis of double-hit follicular lymphoma: Comparison with high-grade B-cell lymphoma with MYC and BCL2 and/or BCL6 rearrangements. *Mod. Pathol.* **2018**, *31*, 313–326. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Miao, Y.; Hu, S.; Lu, X.; Li, S.; Wang, W.; Medeiros, L.; Lin, P. Double-hit follicular lymphoma with MYC and BCL2 translocations: A study of 7 cases with a review of literature. *Hum. Pathol.* **2016**, *58*, 72–77. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Yoshida, M.; Ichikawa, A.; Miyoshi, H.; Kiyasu, J.; Kimura, Y.; Arakawa, F.; Niino, D.; Ohshima, K. Clinicopathological features of double-hit B-cell lymphomas with MYC and BCL2, BCL6 or CCND1 rearrangements. *Pathol. Int.* **2015**, *65*, 519–527. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Christie, L.; Kernohan, N.; Levison, D.; Sales, M.; Cunningham, J.; Gillespie, K.; Batstone, P.; Meiklejohn, D.; Goodlad, J. C-MYC translocation in t(14;18) positive follicular lymphoma at presentation: An adverse prognostic indicator? *Leuk. Lymphoma* **2008**, *49*, 470–476. [[CrossRef](#)]
28. Sha, C.; Barrans, S.; Cucco, F.; Bentley, M.; Care, M.; Cummin, T.; Kennedy, H.; Thompson, J.; Uddin, R.; Worrillow, L.; et al. Molecular high-grade B-cell lymphoma: Defining a poor-risk group that requires different approaches to therapy. *J. Clin. Oncol.* **2019**, *37*, 202–212. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Ennishi, D.; Jiang, A.; Boyle, M.; Collinge, B.; Grande, B.; Ben-Neriah, S.; Rushton, C.; Tang, J.; Thomas, N.; Slack, G.; et al. Double-hit gene expression signature defines a distinct subgroup of germinal center B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma. *J. Clin. Oncol.* **2019**, *37*, 190–201. [[CrossRef](#)]
30. Mundo, L.; Ambrosio, M.R.; Raimondi, F.; Del Porro, L.; Guazzo, R.; Mancini, V.; Granai, M.; Jim Rocca, B.; Lopez, C.; Bens, S.; et al. Molecular switch from MYC to MYCN expression in MYC protein negative Burkitt lymphoma cases. *Blood Cancer J.* **2019**, *9*, 91. [[CrossRef](#)]
31. Gonzalez-Farre, B.; Ramis-Zaldivar, J.E.; Salmeron-Villalobos, J.; Balagué, O.; Celis, V.; Verdu-Amoros, J.; Nadeu, F.; Sábado, C.; Ferrández, A.; Garrido, M.; et al. Burkitt-like lymphoma with 11q aberration: A germinal center-derived lymphoma genetically unrelated to Burkitt lymphoma. *Haematologica* **2019**, *104*, 1822–1829. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Rymkiewicz, G.; Grygalewicz, B.; Chechlinska, M.; Blachnio, K.; Bystydzienski, Z.; Romejko-Jarosinska, J.; Woroniecka, R.; Zajdel, M.; Domanska-Czyz, K.; Martin-Garcia, D.; et al. A comprehensive flow-cytometry-based immunophenotypic characterization of Burkitt-like lymphoma with 11q aberration. *Mod. Pathol.* **2018**, *31*, 732–743. [[CrossRef](#)]
33. Liu, Y.; Bian, T.; Zhang, Y.; Zheng, Y.; Zhang, J.; Zhou, X.; Xie, J. A combination of LMO2 negative and CD38 positive is useful for the diagnosis of Burkitt lymphoma. *Diagn. Pathol.* **2019**, *14*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Ventura, R.A.; Martin-Subero, J.L.; Jones, M.; McParland, J.; Gesk, S.; Mason, D.; Siebert, R. FISH Analysis for the Detection of Lymphoma-Associated Chromosomal Abnormalities in Routine Paraffin-Embedded Tissue. *J. Mol. Diagn.* **2006**, *8*, 141–151. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Article

Clinical Interest of LMO2 Testing for the Diagnosis of Aggressive Large B-Cell Lymphomas

Ivonne Vazquez, Natalia Papaleo, Eugenia Garcia, Marta Salido, Antonio Salar, Silvia Hernandez, Xavier Calvo and Luis Colomo

Table S1. CD10 versus MYC gene status according diagnostic categories in 362 cases of LBCL with available results.

	BL	FL g3A	tDLBCL	DLBCL	HGBL-DH/TH	HGBL, NOS
CD10-positive cases (N) *	28	23	31	83	25	7
MYC-R	28/28 (100%)	0/23 (0%)	7/31 (23%)	10/83 (12%)	25/25 (100%)	6/7 (86%)
MYC non-R	0/28 (0%)	23/23 (100%)	24/31 (77%)	73/83 (88%)	0/25 (0%)	1/7 (14%)
CD10-negative cases (N) *	0	3	12	144	5	1
MYC-R		0/3 (0%)	4/12 (33%)	5/144 (3.5%)	5/5 (100%)	1/1 (100%)
MYC non-R		3/3 (100%)	8/12 (67%)	139/144 (96.5%)	0/5 (0%)	0/1 (0%)

* ($p < 0.005$); MYC-R, MYC rearranged; MYC non-R, MYC non-rearranged.

Table S2. Five year PFS and OS in 112 patients with aggressive LBCL treated with curative intention.

	5 year PFS		5 year OS		5 year OS at transformation	
Diagnosis						
FL g3A		NR		NR		NR
tDLBCL		19		73		71
DLBCL		65		70		77
HGBL, NOS		50		50		50
HGBL-DH/TH	21	$p = 0.007$	28	$p = 0.015$	29	$p = 0.013$
MYC-rearranged	25		40		39	
MYC non-rearranged	57	$p = 0.007$	77	$p = 0.008$	79	$p = 0.006$
MYC +	36		52		45	
MYC -	60	$p = 0.001$	80	$p = 0.001$	80	$p = 0.001$
LMO2 -	37		49		44	
LMO2 +	59	$p = 0.047$	83	$p = 0.002$	81	$p = 0.003$

Table S3. Clinicopathological features of patients with *LMO2* and *MYC* mRNA results.

Case #	Gender, age	Diagnosis	<i>LMO2</i> mRNA	<i>MYC</i> mRNA	<i>MYC</i> : <i>LMO2</i>	<i>MYC</i> status	Follow-up, months
#1	F 94	HGBL-DH/TH	0,0001	0,1180	803,45	R	DwD, 12
#2	M 54	HGBL-DH/TH	0,0014	0,2385	165,93	R	DwD, 1
#3	M 82	HGBL-DH/TH	0,0077	0,2284	29,67	R	DwD, 8
#4	M 61	HGBL-DH/TH	0,0167	0,0423	2,53	R	AneD, 105
#5	M 68	tDLBCL	0,0119	0,1119	9,39	R	AneD, 194
#6	F 78	tDLBCL	0,0079	0,0508	6,41	R	AneD, 87
#7	M 48	tDLBCL	0,0383	0,1265	3,30	A	DwD, 12
#8	M 77	DLBCL	0,0246	0,0107	0,44	G	Dned *, 49

R, rearranged; A, amplified; G, gained; DwD, dead with disease; AneD, alive with no evidence of disease; * Dned, dead with no evidence of disease (dead of liver disease).



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

3.3 Tercer treball:

Lack of expression of LMO2 clone SP51 identifies *MYC* rearrangements in aggressive large B-cell lymphomas

Ivonne Vazquez, Natalia Papaleo, Joan Lop, Anna Puiggros, Blanca Sánchez-González, Eva Gimeno, Marcio Andrade-Campos, Antonio Salar, Blanca Espinet, Marta Salido, Gustavo Tapia, Joaquim Carreras, Ana Ferrer, Leonor Arenillas, Xavier Calvo, Luis Colomo.

Virchows Arch 2021; publicat *on line* 3 d'abril 2021

DOI: 10.1007/s00428-021-03091-9

RESUM

La presència de reordenaments de *MYC* (*MYC*-R) confereixen un pronòstic menys favorable en els limfomes B de cèl·lules grans (LBCL). Donada la baixa incidència d'aquesta alteració genètica, identificar marcadors pel cribratge de *MYC*-R pot ser útil en la pràctica diària. Estudis previs suggereixen que la pèrdua immunohistoquímica de LMO2 amb el clon 1A9-1 és un bon predictor de la presència de *MYC*-R en LBCL. L'article actual estudia la utilitat del clon SP51 de LMO2. Per aquest propòsit, s'han analitzat 20 limfomes de Burkitt (BL) i 325 LBCL. En aquesta sèrie, 245 casos es van estudiar de manera prospectiva utilitzant seccions completes i 100 de manera retrospectiva utilitzant microarrays de teixits (TMA). En la cohort de casos CD10 positius (CD10⁺) s'aconsegueixen millors resultats. La pèrdua d'expressió de LMO2 SP51 prediu la presència de *MYC*-R amb una alta especificitat, precisió, valors predictius positius i negatius (PPV/NPV) i raó de versemblança positiu i negatiu (PLR/NLR). Comparant amb l'expressió immunohistoquímica de *MYC*, LMO2 SP51 obté una millor especificitat, precisió, PPV i PLR (95%, 91%, 85% i 14.33 vs 73%, 77%, 56% i 3.26, respectivament) amb NPV i NLR similar (92% i 0.22 vs 95% i 0.12). Com a conclusió, LMO2 SP51 pot ser un marcador útil pel cribratge de *MYC*-R en LBCL CD10⁺.



Lack of expression of LMO2 clone SP51 identifies *MYC* rearrangements in aggressive large B-cell lymphomas

Ivonne Vazquez^{1,2} · Natalia Papaleo^{1,3,4} · Joan Lop¹ · Anna Puiggros¹ · Blanca Sanchez-Gonzalez⁵ · Ramon Diez-Feijoo⁵ · Eva Gimeno⁵ · Marcio Andrade-Campos⁵ · Antonio Salar⁵ · Blanca Espinet¹ · Marta Salido¹ · Gustavo Tapia⁶ · Joaquim Carreras⁷ · Ana Ferrer^{1,4} · Leonor Arenillas¹ · Xavier Calvo¹ · Luis Colomo^{1,4}

Received: 9 February 2021 / Revised: 9 March 2021 / Accepted: 22 March 2021
© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2021

Abstract

MYC rearrangements (*MYC*-R) confer unfavorable prognosis to large B-cell lymphomas (LBCL). Because of the low incidence of such genetic alteration, surrogates to screen *MYC*-R may be useful in daily practice. Previous studies suggested that clone 1A9-1 of LMO2 loss may be a good predictor for the presence of *MYC*-R in LBCL. The present study examines the utility of LMO2 clone SP51. For this purpose, we have analyzed 20 Burkitt lymphomas and 325 LBCL. Among them, 245 cases were studied prospectively using whole tissue sections, and 100 retrospectively by tissue microarrays. The cohort of CD10-positive prospective cases achieved the best results. Lack of LMO2 SP51 expression predicted the presence of *MYC*-R with high specificity, accuracy, positive and negative predictive value (PPV/NPV), and positive and negative likelihood ratios (PLR/NLR). Compared with *MYC* protein expression, LMO2 SP51 obtained significantly higher specificity, accuracy, PPV, and PLR (94%, 91%, 85%, and 14.33 vs 73%, 77%, 56%, and 3.26, respectively), and similar NPV and NLR (92% and 0.22 vs 95% and 0.12). Compared with LMO2 clone 1A9-1, the sensitivity of LMO2 SP51 was lower (79% vs 89%). We conclude that LMO2 SP51 may be a useful marker to screen *MYC*-R in CD10-positive LBCL.

Keywords *MYC* · LMO2 · Immunohistochemistry · Large B-cell lymphoma

Introduction

LIM domain only-2 (LMO2) is a gene that encodes a transcription factor that regulates embryonic development, angiogenesis, and erythropoiesis. It was originally described as a gene involved in the development of T-cell acute lymphoblastic leukemia, and later as a gene defining the germinal center B-cell (GCB) molecular profile of diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) [1, 2]. At protein level, LMO2 expression is upregulated in normal germinal center (GC) B-cells and in a subset of GC-derived B-cell lymphomas [3, 4]. Different studies, both at RNA and protein expression, have demonstrated that LMO2 is a prognostic marker in DLBCL patients treated with anthracycline-based regimens alone or in combination with rituximab [5–7].

We previously observed that LMO2 expression was frequently downregulated in cases of aggressive large B-cell lymphomas (LBCL) carrying *MYC* rearrangements (*MYC*-R), especially when CD10 was positive. In those cases, the

✉ Luis Colomo
lcolomo@psmar.cat

¹ Department of Pathology, Hospital del Mar, Institut Hospital del Mar d'Investigacions Mèdiques (IMIM), Barcelona, Spain

² Department of Ciències Morfològiques, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

³ Department of Pathology, Consorci Hospitalari Parc Taulí, Sabadell, Spain

⁴ Department of Health and Experimental Sciences, Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, Spain

⁵ Department of Hematology, Hospital del Mar, Institut Hospital del Mar d'Investigacions Mèdiques (IMIM), Barcelona, Spain

⁶ Department of Pathology, Hospital Germans Trias i Pujol, Institut Germans Trias i Pujol (IGTP), Badalona, Spain

⁷ Department of Pathology, School of Medicine, Tokai University, Isehara, Japan

loss of expression of LMO2 was even more efficient than MYC protein expression to identify the presence of MYC-R, being therefore a useful surrogate marker to identify such relevant genetic alteration. In such studies, we evaluated two large independent series by immunohistochemistry (IHC) using clone 1A9-1 of LMO2 [8, 9]. In the present study, we evaluate the adequacy of clone SP51 and examine its prognostic utility in LBCL.

Methods

Detailed material and methods are provided as [Supplementary material](#). Briefly, we studied a series of LBCL including 20 Burkitt lymphoma (BL), 215 DLBCL, 8 high-grade B-cell lymphoma, NOS (HGBL-NOS), 32 HGBL with rearrangements of *MYC* and *BCL2* and/or *BCL6* (HGBL-DH/TH), 44 transformed DLBCL (tDLBCL), and 26 grade 3A follicular lymphomas (FL g3A). We have studied a second series of 91 patients diagnosed of DLBCL treated with curative intention to assess whether LMO2 clone SP51 captured the prognostic impact of variables such as International Prognostic Index (IPI) and *MYC*-R and MYC protein expression.

All cases were evaluated using a common panel of B and T-cell markers, LMO2 clones SP51 and 1A9-1, and MYC (clone Y69). The cutoff for the positivity of LMO2 and MYC was 30% and 40%, respectively. LMO2 and MYC were prospectively evaluated using whole tissue sections (WTS) in 245 cases, whereas 100 cases were retrospectively evaluated using tissue microarrays (TMA). We analyzed the results of both cohorts together and separately.

FISH studies using break-apart probes for *MYC* and *BCL6* and dual fusion *IGH/BCL2* were used and interpreted as previously described [8–10]. The criterion for inclusion of cases in addition to diagnosis was the availability of simultaneous results for both clones of LMO2 and MYC by IHC, as well as for *MYC* FISH. Statistical analyses were performed as described in the [Supplementary material](#).

Results

The baseline characteristics of the patients and immunohistochemical and genetic alterations of cases with available data are described in Table 1. LMO2 clone SP51 was expressed in 212/345 (61%) and clone 1A9-1 in 199/345 (58%) cases. Agreeing results between both clones were obtained in 322 cases (κ coefficient of 0.86, $P < 0.005$). Eighteen cases expressed LMO2 SP51 but not 1A9-1 (14 DLBCL, 2 tDLBCL, and 2 HGBL-DH/TH). Three (17%) were evaluated using TMA and 15 (83%) by WTS. Among DLBCL, 4/14

(29%) cases had a GCB-like IHC profile following Hans algorithm [11], as tDLBCL and HGBL-DH/TH cases. On the contrary, 5 cases were LMO2 SP51-negative and LMO2 1A9-1-positive; all cases were DLBCL evaluated retrospectively, 3/5 (60%) GCB-like.

Among 212 DLBCL with available information, 98 (46%) had GCB-like IHC profile and 114 were non-GCB. Twenty-nine out of 32 (91%) HGBL-DH/TH and 7/8 (88%) HGBL-NOS could be classified as GCB-like. LMO2 SP51 expression was statistically associated with GCB-like profile in the categories of tDLBCL and DLBCL, but not in HGBL-DH/TH and HGBL-NOS since LMO2 was downregulated in 19/29 (65%) and 5/7 (71%) GCB-like cases, respectively. LMO2 SP51 also associated with CD10 expression in tDLBCL and DLBCL, but not HGBL-DH/TH and HGBL-NOS, which downregulated LMO2 in 17/27 (63%) and 5/7 (71%) CD10 positive cases.

Considering the whole series, *MYC*-R were identified in 90/345 (26%) cases, 74 (82%) of them occurring in CD10-positive tumors. Excluding BL and FL g3A, *MYC*-R had an incidence of 56/68 (82%) in GCB-like cases. Similarly to our previous studies, the loss of LMO2 SP51 clone was statistically associated with the presence of *MYC*-R, and LMO2 SP51 loss was observed in 70/90 (78%) cases compared with 73/90 (81%) using LMO2 1A9-1 ($P < 0.001$ for both clones). The sensitivity for the detection of *MYC*-R with clone SP51 did not substantially change when retrospective and prospective cohorts were analyzed (76% vs 78%, respectively). However, using LMO2 clone 1A9-1, the sensitivity increased in the prospective series compared with retrospective cases, especially among CD10-positive cases (81%, 76%, and 89%, respectively) (Supplementary Table 1). Moreover, as described for 1A9-1 [8], when LMO2 SP51 was positive in CD10 negative cases or non-GCB cases, *MYC*-R occurred very rarely (2% and 1%, respectively; $P < 0.005$ for both) (Fig. 1).

Table 2 shows the comparison of the statistic measures of performance of both clones of LMO2 and MYC with the presence of *MYC* gene rearrangements as gold standard. All markers obtained similar results when the whole series was analyzed. The retrospective series offered superior results for MYC than LMO2. However, both clones of LMO2 obtained better results than MYC when the prospective CD10-positive cohort was assessed, and specificity, accuracy, positive predictive value (PPV), and positive likelihood ratio (LR) values of LMO2 exceeded MYC results. In addition, LMO2 1A9-1-negative PV and negative LR surpassed MYC values.

Finally, we performed survival analyses in a group of 91 DLBCL cases to evaluate whether LMO2 SP51 captured the prognosis value of known variables. [Supplementary Table 2](#) shows the results of median progression-free survival (PFS)

Table 1 Clinicopathological features and *MYC* gene alterations detected by FISH in 345 samples of LBCL from 333 patients

Clinical features	BL	FL g3A	tDLBCL	DLBCL	HGBL-DH/TH	HGBL-NOS
<i>N</i>	20	26	44	215	32	8
Median age	32 (2–65)	64 (39–89)	64 (40–82)	65 (27–97)	67 (39–94)	62 (42–89)
Gender (male/female)	12/8	16/10	22/18	125/84	19/11	4/4
IHC						
CD10+	19/20 (95%)	24/26 (92%)	32/44 (73%)	85/214 (40%)	27/32 (84%)	7/8 (87%)
BCL6+	18/18 (100%)	26/26 (100%)	42/44 (95%)	193/210 (92%)	28/32 (87%)	8/8 (100%)
MUM1/IRF4+	7/12 (58%)	5/17 (29%)	20/41 (49%)	161/208 (77%)	12/31 (39%)	4/8 (50%)
BCL2+	2/19 (10%)	20/26 (77%)	39/43 (91%)	169/205 (82%)	29/31 (93%)	3/8 (37%)
MYC+	15/20 (75%)	0/26	15/44 (34%)	75/215 (35%)	31/32 (97%)	7/8 (87%)
LMO2 SP51+	0/20	25/26 (96%)	33/44 (77%)	142/215 (66%)	10/32 (31%)	2/8 (25%)
LMO2 1A9-1+	0/20	25/26 (96%)	31/44 (70%)	133/215 (62%)	8/32 (25%)	2/8 (25%)
FISH						
<i>MYC</i> -R	20/20 (100%)	1/26 (4%)	13/44 (29%)	17/215 (8%)	32/32 (100%)	7/8 (87%)
<i>BCL2</i> -R	0/8	12/26 (46%)	27/41 (66%)	32/185 (17%)	27/31 (86%)	0/8
<i>BCL6</i> -R	0/8	3/24 (12%)	14/41 (34%)	45/170 (26%)	12/31 (39%)	0/8

IHC, immunohistochemistry; *MYC*-R, *MYC* rearranged; *BCL2*-R, *BCL2* rearranged; *BCL6*-R, *BCL6* rearranged

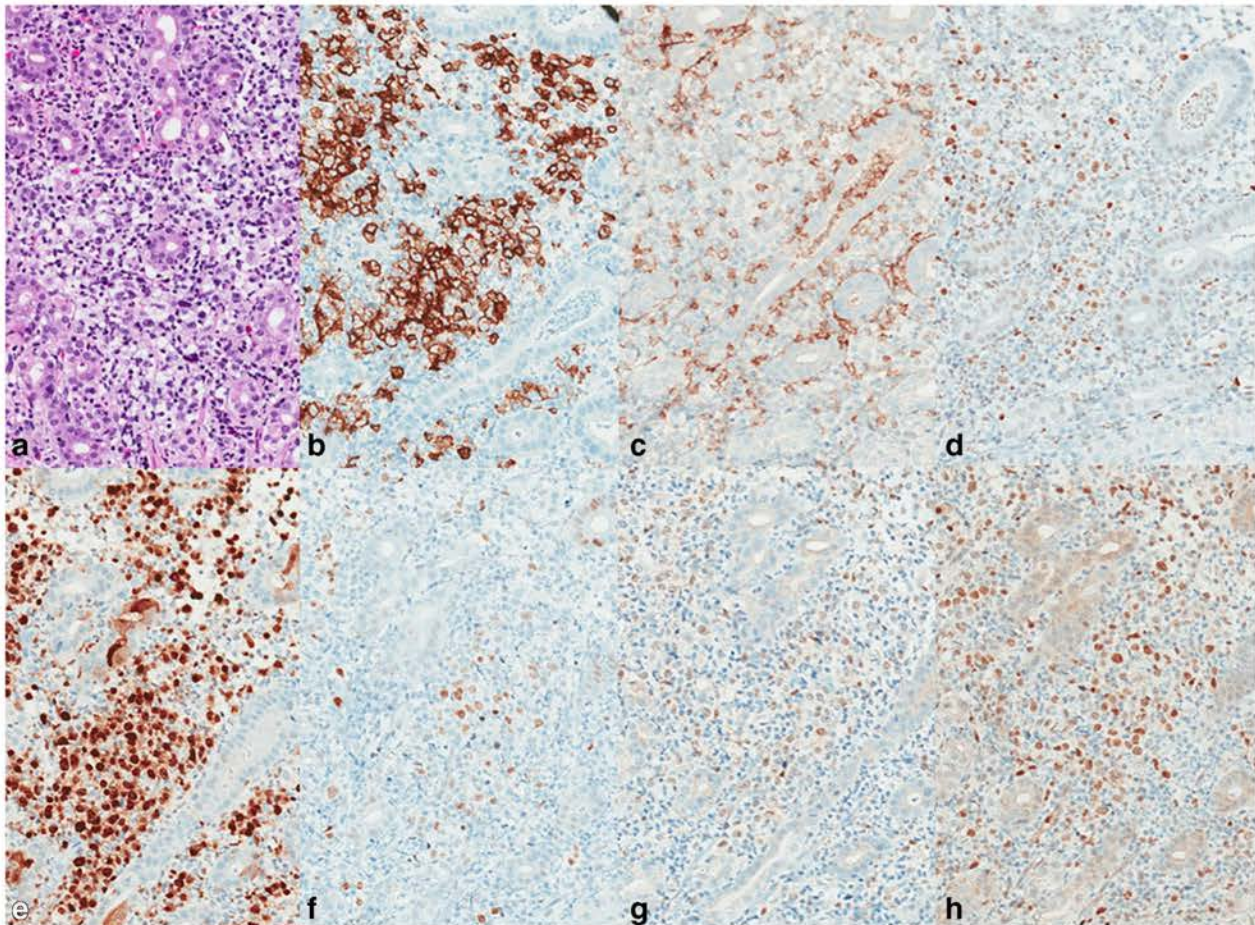


Fig. 1 Gastric DLBCL *MYC* non-rearranged with non-GCB profile (all $\times 200$). HE (a), CD20 (b), CD10 (c), BCL6 (d), IRF4/MUM1 (e), MYC (f), LMO2 1A9-1 (g), and LMO2 SP51 (h)

Table 2 Statistic measures of the performance of LMO2 and MYC expression compared with the presence of *MYC* gene rearrangements as gold standard in LBCL

	All series (N = 345)			Prospective series (N = 245)			CD10+ prospective series (N = 101)*		
	LMO2 SP51	LMO2 1A9-1	MYC	LMO2 SP51	LMO2 1A9-1	MYC	LMO2 SP51	LMO2 1A9-1	MYC
Sensitivity (%)	78	81	88	80	87	87	79	89	89
Specificity (%)	75	71	75	79	73	79	94	92	73
Accuracy (%)	76	74	79	80	76	81	91	91	77
PPV (%)	53	50	56	47	42	49	85	81	56
NPV (%)	91	91	95	95	96	96	92	96	95
Positive LR	3.15	2.83	3.55	3.9	3.27	4.23	14.33	10.86	3.26
Negative LR	0.29	0.26	0.16	0.25	0.18	0.17	0.22	0.12	0.15

PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value; LR, likelihood ratio

*Cohort excluding BL and FL to avoid potential bias caused by overrepresentation of CD10+ cases

and overall survival (OS) for IPI, *MYC*-R, *MYC*, and LMO2 SP51 protein expression. The 5-year PFS was shorter for DLBCL with loss of expression of LMO2 SP51 (55% vs 63%, $P = 0.34$). The 5-year OS was significantly shorter for DLBCL LMO2-negative cases (60% vs 84%, $P = 0.02$). Moreover, in the latter cohort, a Cox regression survival analysis including the model the International Prognostic Index (IPI), *MYC*-R, *MYC* protein, and LMO2 for 72 cases, only IPI (HR: 1.99; CI 1.23–3.22; $P = 0.008$) and LMO2 (HR: 0.3; CI 0.11–0.85; $P = 0.02$) were the significant variables to predict OS.

Discussion

Large B-cell lymphomas (LBCL) encompass different clinicopathological entities and categories, some of them defined by the presence of *MYC*-R. Such genetic alteration confers unfavorable prognosis to these diseases, although its incidence is low. In this series, we had a high prevalence of 26% *MYC*-R due to the high number of cases received for cytogenetic studies or in consultation. However, considering a 5-year interval comprised between years 2015 and 2019, and including only cases diagnosed and treated in our institution, the incidence of *MYC*-R among LBCL in tDLBCL and DLBCL was of 1.7% and 4.7% for the aforementioned period, respectively. During the same interval, the incidence of HGBL-DH/TH among all LBCL was 5.3%. Therefore, due to the low incidence of *MYC*-R, we wanted to identify markers to screen the presence of this genetic alteration.

In this study, we have evaluated the performance of LMO2 clone SP51, comparing the results obtained with LMO2 clone 1A9-1. In our previous studies, we identified the clinical utility of the clone 1A9-1 for the identification of *MYC*-R in LBCL, particularly in CD10-positive cases. Using SP51, we have obtained similar results, but some differences have

arisen. The most important reason for such differences must be attributed to the source of the antibodies. Clone SP51 is a rabbit monoclonal antibody (RabMA), whereas clone 1A9-1 is a mouse monoclonal antibody (MMA). Some studies have shown that RabMA has higher sensitivity and affinity for the targeted epitopes than MMA because of the differences in the B-cell repertoires in both species [12, 13]. The effects of such difference in our series are higher specificity and positive LR for SP51 but, on the contrary, lower sensitivity because of the detection of higher number of false-negative cases with *MYC*-R. These differences were already observed in the studies dealing with both clones of LMO2 [3, 4]. Natkunam et al. cloned and characterized LMO2 1A91, and later Agostinelli et al. described the results of SP51 in a large series of cases and cell lines. In this study, the authors noted staining of the mantle zone and monocytoid cells in normal tonsil and lymph nodes, not observed with 1A9-1. Such differences on the affinity of the clones may be also the reason for the higher number of non-GCB DLBCL detected with SP51, and the differences observed between prospective and retrospective cohorts.

Compared with *MYC* protein, SP51 obtained better results for the identification of *MYC*-R in the CD10-positive cohort, as occurred with 1A9-1. However, *MYC* showed higher efficiency to stain cases in the retrospective series, being 1A9-1 a little more accurate than SP51 in this setting. Finally, although the optimal prognostic characterization of LBCL should include different approaches [14, 15], clone SP51 was able to capture the prognostic features of well-known variables as previously observed for 1A9-1 [7, 9].

In summary, we describe the clinical utility of clone SP51 to screen *MYC*-R in LBCL. The interest of including LMO2 in routine immunohistochemical panels to evaluate LBCL is confirmed in this study, especially when CD10-positive LBCL are identified. Further studies should reproduce the obtained data.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s00428-021-03091-9>.

Acknowledgements The authors want to thank Xenia Riera, Maria Rodriguez-Rivera, and Lola Tobalina for their excellent technical assistance and English editing.

Code availability Not applicable

Author contribution Conceptualization: Ivonne Vazquez and Luis Colomo; methodology: Ivonne Vazquez, Blanca Espinet, Marta Salido, and Anna Puiggros; formal analysis and investigation: Ivonne Vazquez, Antonio Salar, and Luis Colomo; writing - original draft preparation: Ivonne Vazquez, Natalia Papaleo, Joan Lop, Blanca Sanchez-Gonzalez, Ramon Diez-Feijoo, Eva Gimeno, Marcio Andrade-Campos, Antonio Salar, Blanca Espinet, Marta Salido, Anna Puiggros, Gustavo Tapia, Joaquin Carreras, Ana Ferrer, Leonor Arenillas, Xavier Calvo, and Luis Colomo; writing - review and editing: Ivonne Vazquez and Luis Colomo; funding acquisition: Luis Colomo; supervision: Luis Colomo.

Funding This research was funded by the grant Fondo de Investigacion Sanitaria (FIS), Instituto de Salud Carlos III PI17/313 (L.C.).

Data availability The datasets generated during and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Declarations

Conflict of interest The authors declare no competing interests.

References

- Lefranc MP, Rabbitts TH (1985) Two tandemly organized human genes encoding the T-cell γ constant-region sequences show multiple rearrangement in different T-cell types. *Nature*. 316:464–466. <https://doi.org/10.1038/316464a0>
- Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, Boldrick JC, Sabet H, Tran T, Yu X, Powell JL, Yang L, Marti GE, Moore T, Hudson J Jr, Lu L, Lewis DB, Tibshirani R, Sherlock G, Chan WC, Greiner TC, Weisenburger DD, Armitage JO, Wamke R, Levy R, Wilson W, Grever MR, Byrd JC, Botstein D, Brown PO, Staudt LM (2000) Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 403: 503–511. <https://doi.org/10.1038/35000501>
- Natkunam Y, Zhao S, Mason DY, Chen J, Taidi B, Jones M, Hammer AS, Hamilton Dutoit S, Lossos IS, Levy R (2007) The oncoprotein LMO2 is expressed in normal germinal-center B cells and in human B-cell lymphomas. *Blood* 109:1636–1642. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-08-039024>
- Agostinelli C, Paterson JC, Gupta R, Righi S, Sandri F, Piccaluga PP, Bacci F, Sabatini E, Pileri SA, Marafioti T (2012) Detection of LIM domain only 2 (LMO2) in normal human tissues and haematopoietic and non-haematopoietic tumours using a newly developed rabbit monoclonal antibody. *Histopathology* 61:33–46. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2012.04198.x>
- Lenz G, Wright G, Dave SS, Xiao W, Powell J, Zhao H, Xu W, Tan B, Goldschmidt N, Iqbal J, Vose J, Bast M, Fu K, Weisenburger DD, Greiner TC, Armitage JO, Kyle A, May L, Gascoyne RD, Connors JM, Troen G, Holte H, Kvaloy S, Dierickx D, Verhoef G, Delabie J, Smeland EB, Jares P, Martinez A, Lopez-Guillermo A, Montserrat E, Campo E, Braziel RM, Miller TP, Rimsza LM, Cook JR, Pohlman B, Sweetenham J, Tubbs RR, Fisher RI, Hartmann E, Rosenwald A, Ott G, Muller-Hermelink HK, Wrench D, Lister TA, Jaffe ES, Wilson WH, Chan WC, Staudt LM (2008) Stromal gene signatures in large-B-cell lymphomas. *N Engl J Med*. 359:2313–2323. <https://doi.org/10.1056/nejmoa0802885>
- Malumbres R, Chen J, Tibshirani R, Johnson NA, Sehn LH, Natkunam Y, Briones J, Advani R, Connors JM, Byrne GE, Levy R, Gascoyne RD, Lossos IS (2008) Paraffin-based 6-gene model predicts outcome in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with R-CHOP. *Blood* 111:5509–5514. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-02-136374>
- Natkunam Y, Farinha P, Hsi ED, Hans CP, Tibshirani R, Sehn LH, Connors JM, Gratzinger D, Rosado M, Zhao S, Pohlman B, Wongchaowart N, Bast M, Avigdor A, Schiby G, Nagler A, Byrne GE, Levy R, Gascoyne RD, Lossos IS (2008) LMO2 protein expression predicts survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with anthracycline-based chemotherapy with and without rituximab. *J Clin Oncol* 26:447–454. <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.13.0690>
- Colomo L, Vazquez I, Papaleo N, Espinet B, Ferrer A, Franco C, Comerna L, Hernandez S, Calvo X, Salar A, Climent F, Mate JL, Forcada P, Mozos A, Nonell L, Martinez A, Carrio A, Costa D, Dlouhy I, Salaverria I, Martin-Subero JI, Lopez-Guillermo A, Valera A, Campo E (2017) LMO2-negative expression predicts the presence of MYC translocations in aggressive B-cell lymphomas. *Am J Surg Pathol* 41:877–886. <https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000000839>
- Vazquez I, Papaleo N, Garcia E et al (2020) Clinical interest of LMO2 testing for the diagnosis of aggressive large B-cell lymphomas. *Cancers (Basel)* 12:884. <https://doi.org/10.3390/cancers12040884>
- Ventura RA, Martin-Subero JI, Jones M, McParland J, Gesk S, Mason DY, Siebert R (2006) FISH analysis for the detection of lymphoma-associated chromosomal abnormalities in routine paraffin-embedded tissue. *J Mol Diagnostics* 8:141–151. <https://doi.org/10.2353/jmoldx.2006.050083>
- Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, Gascoyne RD, Delabie J, Ott G, Müller-Hermelink HK, Campo E, Braziel RM, Jaffe ES, Pan Z, Farinha P, Smith LM, Falini B, Banham AH, Rosenwald A, Staudt LM, Connors JM, Armitage JO, Chan WC (2004) Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood* 103:275–282. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-05-1545>
- Rossi S, Laurino L, Furlanetto A, Chinellato S, Orvieto E, Canal F, Facchetti F, Dei Tos AP (2005) Rabbit monoclonal antibodies: a comparative study between a novel category of immunoreagents and the corresponding mouse monoclonal antibodies. *Am J Clin Pathol*. 124:295–302. <https://doi.org/10.1309/nr8h-n08g-dpve-mu08>
- Weber J, Peng H, Rader C (2017) From rabbit antibody repertoires to rabbit monoclonal antibodies. *Exp Mol Med* 49:e305. <https://doi.org/10.1038/emm.2017.23>
- Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, Advani R, Ghielmini M, Salles GA, Zelenetz AD, Jaffe ES (2016) The 2016 revision of the World Health Organization (WHO) classification of lymphoid neoplasms. *Blood* 127:2375–2390. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-01-643569>
- Chapuy B, Stewart C, Dunford AJ, Kim J, Kamburov A, Redd RA, Lawrence MS, Roemer MGM, Li AJ, Ziepert M, Staiger AM, Wala JA, Ducar MD, Leshchiner I, Rheinbay E, Taylor-Weiner A, Coughlin CA, Hess JM, Pedamallu CS, Livitz D, Rosebrock D, Rosenberg M, Tracy AA, Horn H, van Hummelen P, Feldman AL, Link BK, Novak AJ, Cerhan JR, Habermann TM, Siebert R, Rosenwald A, Thomer AR, Meyerson ML, Golub TR, Beroukhim

R, Wulf GG, Ott G, Rodig SJ, Monti S, Neuberger DS, Loeffler M, Pfreundschuh M, Trümper L, Getz G, Shipp MA (2018) Molecular subtypes of diffuse large B cell lymphoma are associated with distinct pathogenic mechanisms and outcomes. *Nat Med.* 24:679–690. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0016-8>

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

1. Supplementary Tables

Supplemental Table 1. Sensitivity of LMO2 clones SP51 and 1A1-9, and MYC for the detection of MYC-R

	MYC-R / All cases (90 / 345)	MYC-R / Prospective cases (45 / 245)	MYC-R / Prospective cases* (39 / 214)	MYC-R / CD10+ Prospective cases* (28 / 101)	MYC-R / Retrospective cases (45 / 100)
LMO2 SP51	70/90 (78%)	36/45 (80%)	31/39 (79%)	22/28 (79%)	34/45 (76%)
LMO2 1A9-1	73/90 (81%)	39/45 (87%)	34/39 (87%)	25/28 (89%)	34/45 (76%)
MYC	79/90 (88%)	39/45 (87%)	35/39 (90%)	25/28 (89%)	40/45 (89%)

*Cohort excluding BL and FL to avoid potential bias caused by overrepresentation of CD10+ cases

Supplemental Table 2. Clinical features and survival in DLBCL patients

	DLBCL (N=91)
Median age (range) years	64 (27-86)
Male / Female	51 / 40
IPI Low Low-intermediate High-intermediate High	33 / 88 (37%) 19 / 88 (22%) 18 / 88 (20.5%) 18 / 88 (20.5%)
IHC / FISH MYC+ IHC LMO2- IHC MYC-rearranged	29 / 86 (34%) 25 / 81 (31%) 2 / 82 (2%)
Response Complete response Partial response No response/progression	72 (79%) 9 (10%) 10 (11%)
Median PFS / OS (months) IPI high MYC-rearranged MYC+ IHC LMO2- IHC	9.1 / 67.1 4* / 4 51.4 / 86.7 70.8* / 93.1

PFS, Progression Free Survival; OS, Overall Survival; IHC, immunohistochemistry; FISH, Fluorescence *in situ* hybridization; all survival results were significant ($P < 0.05$) except * $P > 0.05$

2. Supplementary Methods

1.1. Case Selection

The series comprised patients diagnosed at our institution of large B cell lymphoma (LBCL), according to WHO criteria [1] and included Burkitt lymphoma (BL), grade 3A follicular lymphoma (FLg3A), diffuse large B cell lymphoma (DLBCL), high-grade B-cell lymphoma with *MYC* and *BCL2* and/or *BCL6* rearrangements (HGBL-DH/TH), high-grade B-cell lymphoma, not otherwise specified (HGBL-NOS), and diffuse large B-cell lymphoma transformed from low grade B-cell lymphoma (tDLBCL). This series included cases of LBCL received at our institution both as diagnostic consultation and to perform cytogenetic studies. Primary mediastinal large B-cell lymphoma, T-cell/histiocyte-rich B-cell lymphoma, HHV8-associated lymphoproliferative disorders, plasmablastic lymphoma and transformed myeloma were not included in the study. Four patients had primary CNS DLBCL, 4 cases occurred in were HIV-positive patients (2 HGBL-NOS, 1 DLBCL and 1 BL), and 3 were EBV-positive (2 BL and 1 HGBL-NOS). All these cases were not included in the survival analyses.

All cases were diagnosed between 2000 and 2019. The only inclusion criterion was the availability of adequate histological material to obtain the immunohistochemical study of both clones of LMO2 (SP51 and 1A9-1) and *MYC*, and *MYC* gene rearrangements (*MYC*-R) by interphase fluorescence *in situ* hybridization (FISH).

For survival analysis purposes, clinical data (including IPI, gender, response to treatment and follow-up) of 91 patients diagnosed and treated at Hospital del Mar between 2002 and 2019 were collected and analyzed. Sixty-five patients were treated with anthracycline-based chemotherapy with rituximab [R-CHOP (rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone or prednisolone)], 15 patients received non-pegylated liposome-encapsulated doxorubicin (NPLD) in modified-R CHOP regimen (R-CMyOP), and 11 patients dose-adjusted EPOCH-R [DA-EPOCH-R (etoposide, prednisone, vincristine, cyclophosphamide, doxorubicin, and rituximab)].

The Ethics Committee of the Hospital del Mar of Barcelona (2017/7481/I) approved the study. Informed consent to use both clinical data and histological material was obtained in accordance with the Declaration of Helsinki.

Applying the criteria described above, the series consisted of 345 samples from 333 patients: 20 samples of BL, 26 FLg3A, 215 DLBCL, 32 HGBL-DH/TH, 8 HGBL-NOS and 44 tDLBCL. Ten patients had 2 samples and one had 3 samples. The group of tDLBCL included 39 transformed FL, 3 transformed marginal zone lymphomas, 2 lymphoplasmacytic lymphomas.

1.2. Immunohistochemistry

Tissue fixation (10% buffered formalin) and processing were performed following standard methods. Immunohistochemical stains were carried out for each case with a panel of monoclonal and polyclonal antibodies reactive in paraffin-embedded tissue sections using fully automated protocols on a BenchMark XT and Ultra immunostainers (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ). The antibodies used included a common B- and T-cell markers [CD20 (clone L26), CD79a (clone SP18), CD3 (clone 2GV6), CD5 (clone SP19)], BCL2 (clone 124), CD10 (clone SP67), BCL6 (clone GI191E-A8), MUM1/IRF4 (clone MRQ-43), Ki-67 (clone MIB-1), and MYC (clone Y69). LMO2 expression was assessed using both clones 1A9-1 and SP51 (Ventana, Roche, Tucson, AZ), following the manufacturer's instructions. LMO2 SP51 was incubated for 20 min after the antigen retrieval with CC1 solution for 48 minutes and detected by OptiView Universal DAB Detection Kit in an automated immunostainer (Benchmark XT; Ventana). LMO2 1A9-1 was performed as described earlier [2]. Appropriate controls were used for all stains. Cell of origin (COO) was assigned for DLBCL samples by using the Hans immunohistochemistry algorithm [3].

Immunohistochemical results of cases diagnosed after September 2014 were evaluated as a part of the diagnostic workflow using whole tissue sections (WTS) (245 cases), but for those diagnosed before, the assessment was done retrospectively. For these cases tissue microarrays (TMAs) were constructed, using a tissue arrayer (MTA I; Beecher Instruments Inc, Sun Prairie, WI, USA) that contained representative 1-mm cores from tumor. One hundred cases were studied using this method. When there were multiple samples from the same specimen the higher score was considered. Internal control cores were present in each TMA.

1.3. Fluorescence In Situ Hybridization (FISH)

All cases included in the study were analyzed by FISH to establish the presence of *MYC*-R at 8q24 using break-apart probes (BAP). For *BCL2* dual fusion probes *IGH/BCL2* were used, whereas BAP probes were performed for *BCL6*, as previously described, all from Vysis (Abbott Molecular, Des Plaines, IL, USA). The criteria of Ventura et al were followed to determine the cut-off values for the interphase[4].

1.4 Statistical analysis

Data were compared using Chi-square test, unpaired t-tests, or nonparametric tests when necessary. *p* values < 0.05 were considered statistically significant for all tests. Accuracy, sensitivity, specificity, and positive and negative predictive values of LMO2 were calculated for 334 patients included. Likelihood positive and negative ratios

were calculated to evaluate diagnostic accuracy. Definitions of complete response, progression-free survival, and overall survival were used, and survival analysis were carried out according to the method described by Kaplan and Meier and the curves compared by the log-rank test. Multivariate models for survival were performed using the stepwise proportional hazards model (Cox) as previously described [5–7]. Prevalence of *MYC*-R corresponded to the proportion of such genetic alteration and the number of cases included in the study. The incidence of *MYC*-R amongst LBCL in tDLBCL and DLBCL was calculated considering the proportion between such diagnosis and the total number of LBCL diagnosed and treated at Hospital del Mar, which covers a health area of approximately 300.000 inhabitants, during the period 2015-2019. The incidence of HGBL-DH/TH was calculated considering the proportion between such diagnosis and the total number of LBLC diagnosed and treated at Hospital del Mar during the same period.

References

1. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Arber DA, Hasserjian RP, Le Beau M, Orazi A (2017) WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues (Revised 4th edition). IARC, Lyon.
2. Colomo L, Vazquez I, Papaleo N, et al (2017) LMO2-negative Expression Predicts the Presence of MYC Translocations in Aggressive B-Cell Lymphomas. *Am J Surg Pathol* 41:877–886. <https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000000839>
3. Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, et al (2004) Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood* 103:275–282. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-05-1545>
4. Ventura RA, Martin-Subero JI, Jones M, et al (2006) FISH Analysis for the Detection of Lymphoma-Associated Chromosomal Abnormalities in Routine Paraffin-Embedded Tissue. *J Mol Diagnostics* 8:141–151. <https://doi.org/10.2353/jmoldx.2006.050083>
5. Kaplan EL, Meier P (1958) Nonparametric Estimation from Incomplete Observations. *J Am Stat Assoc.* 53:457-81. <https://doi.org/10.2307/2281868>
6. Cox DR (1972) Regression Models and Life-Tables. *J R Stat Soc Ser B.* 34:187-220 <https://doi.org/10.1111/j.2517-6161.1972.tb00899.x>
7. Cheson BD, Pfistner B, Juweid ME, et al (2007) Revised response criteria for malignant lymphoma. *J. Clin. Oncol* 25:579-86. <https://doi.org/10.1200/JCO.2006.09.2403>

4. Discussió

4.1 Discussió conjunta

MYC és un dels oncogens més freqüentment involucrats en les neoplàsies malignes en humans, tant hematològiques com neoplàsies sòlides, com el càncer de mama o ovari (Deming SL, 2000) (Blancato J, 2004) (Baker VV, 1990). És un factor de transcripció que controla múltiples gens relacionats en la regulació de funcions cel·lulars com del cicle cel·lular, replicació del DNA i divisió, creixement, metabolisme i diferenciació cel·lular entre altres. També actua regulant l'apoptosi. La seva desregulació comporta una transformació cel·lular permetent a les cèl·lules proliferar i evitar la mort cel·lular. En els tumors sòlids humans l'activació de *MYC* es deu principalment a l'amplificació del gen. En canvi, en les neoplàsies hematològiques s'han descrit diferents mecanismes com a causes de la desregulació de *MYC*: mutacions, guany del nombre de còpies i amplificacions, així com translocacions del gen. Les alteracions d'aquest gen s'han demostrat en la majoria de limfomes B així com relacionat amb la transformació de limfomes de baix grau a limfomes agressius (Filip D, 2020) (Cai Q, 2015).

En les neoplàsies hematològiques, la translocació de *MYC* és l'alteració citogenètica distintiva dels BL i té una prevalença del 5-15% en els DLBCL, NOS, 20-35% en HGBL, NOS i es presenta, per definició, en els HGBL-DH/TH. La seva identificació és d'important rellevància doncs, a part de tenir un paper diagnòstic, té implicacions pronòstiques en els DLBCL, NOS donat que identifica un subgrup amb un comportament clínic més agressiu i pitjor pronòstic (Barrans S, 2010) (Savage KJ, 2009) (Johnson NA S. K., 2009) (Snuderl M, 2010). La seva detecció en la pràctica clínica precisa d'estudis citogenètics (cariotip i/o FISH). Tot i això, l'estudi del cariotip pot no detectar reordenaments críptics i les tècniques de FISH d'interfase utilitzant proves BAP poden no reconèixer entre un 4-10% de reordenaments de *MYC*. Aquestes tècniques són costoses i no estan a l'abast de tots els laboratoris, i l'aproximació diagnòstica que ofereix la classificació de WHO no defineix clarament si cal utilitzar marcadors immunohistoquímics per intentar fer *screening* dels reordenaments de *MYC* o analitzar genèticament tots els LBCL.

Alguns autors proposen una primera aproximació per indicar l'estudi de *MYC* FISH en els LBCL: les tècniques citogenètiques s'haurien de realitzar en aquells casos que plantegen el diagnòstic de BL i/o aquells en què la presència de *MYC-R* sigui >20%, com en el HGBL-NOS, limfomes plasmablàstics i en pacients amb antecedents de FL i transformació histològica (Perry AM C. D., 2013) (Agarwal R, 2016) (Pedersen MO, 2012). A més, per a descartar un HGBL-DH, l'estudi de FISH s'hauria de fer en tots aquests casos, a pesar que la incidència de HGBL-DH/TH és baixa. Es recomana fer inicialment proves BAP i, posteriorment, en cas de reordenament, fer estudis doble-fusió per la valoració del 'partner' (Sesques P, 2017).

Malgrat aquestes recomanacions, la incidència de translocacions de *MYC* és en general baixa i, per tant, altres estratègies són necessàries per identificar aquells casos que tinguin una alta probabilitat de presentar-la. Les tècniques immunohistoquímiques són més barates, accessibles als departaments de patologia i s'utilitzen de manera rutinària. La determinació de *MYC* per sobre del llindar establert del 40% de cèl·lules tumorals positives no sempre tradueix la presència de translocacions del gen.

L'observació de la disminució de l'expressió de marcadors del GC en els treballs de 2006 de Dave *et al.* i Hummel *et al.* va fer preguntar-nos si realment el BL i altres LBCL amb reordenaments de *MYC*, tot i expressar gens de cèl·lules B del GC, tenien una expressió baixa de *LMO2*. Donat que el BL es caracteritzen per la presència de *MYC-R*, la hipòtesi de treball i l'inici d'aquesta tesi doctoral tenia l'objectiu de determinar si l'absència d'expressió immunohistoquímica de *LMO2* predeia la presència de *MYC-R* en LBCL i per tant, avaluar el seu ús com a marcador immunohistoquímic de cribratge.

Amb els treballs prèviament presentats, hem demostrat que **LMO2 és un marcador que permet identificar *MYC-R* en els LBCL**. S'han estudiat tres sèries de casos de LBCL (BL, DLBCL, HGBL,NOS, HGBL-DH/TH, incloent en els dos darrers treballs, casos FL grau 3A i tDLBCL) observant que aquells que presenten *MYC-R* són, majoritàriament, *LMO2*⁻ o presenten nivells d'expressió baixos. L'absència de l'expressió de *LMO2* en aquest grup de limfomes,

particularment en els CD10⁺ o amb un fenotip GCB pot ser una eina útil per seleccionar els casos en els que s'han de fer estudis citogenètics de FISH, amb una alta sensibilitat, especificitat, PPV i precisió. Aquesta dada també és útil per detectar els HGBL-DH/TH, doncs, la gran majoria són CD10⁺. La presència de *MYC*-R, per contra, és poc freqüent en els LBCL CD10⁻ o amb perfil no-GCB que mantenen l'expressió de LMO2, doncs aquesta alteració només es presenta en <5% d'aquests casos.

Malgrat que s'han obtingut resultats similars amb els dos clons de LMO2 (1A9-1 i SP51) i, per tant, tots dos són útils per a la identificació de *MYC*-R, s'han observat algunes diferències entre ells, essent LMO2 1A9-1 més sensible però menys específic que SP51. Aquestes diferències podrien ser explicades per l'origen dels anticossos. LMO2 1A9-1 és un clon de ratolí mentre que SP51 és un clon de conill. Aquests últim tipus d'anticossos són més antigènics i tenen major afinitat que els d'altres espècies. En aquest cas, on estem identificant una pèrdua d'expressió proteica, la major afinitat de SP51 dona lloc a uns resultats de menor especificat.

L'anàlisi estadística també demostra que ambdós clons de LMO2 reconeixen la presència de *MYC*-R millor que *MYC*, particularment en els casos CD10⁺. Una possible explicació és que les causes que condueixen a una sobreexpressió de *MYC* són heterogènies, de manera que no sempre responen a translocacions d'aquest gen.

Aquests resultats permeten aconsellar l'ús rutinari de la determinació immunohistoquímica de LMO2 en l'estudi de LBCL (Figura 14 i 15, Annex), preferiblement durant la seva valoració prospectiva, tot i que també pot ser utilitzat de manera retrospectiva.

En quant al paper de **LMO2 com a factor pronòstic**, hi ha diversos estudis publicats en DLBCL al respecte, tant a nivell d'expressió gènica com proteica (Lossos IS C. D., 2004) (Malumbres R, 2008) (Natkunam Y F. P., 2008). En els darrers dos treballs d'aquesta tesi s'ha avaluat l'impacte clínic de LMO2 observant que els pacients amb major expressió immunohistoquímica de LMO2,

tant amb el clon 1A9-1 com amb SP51, tenien millor 5a-PFS i 5a-OS independentment del tractament rebut. De manera interessant, es van identificar 8 LBCL CD10⁺ amb MYC-R/LMO2⁺ que es van anomenar “casos dissociats (DC)” [3 tDLBCL (tots ells transformats de FL) i 5 HGBL-DH/TH] i es va realitzar un sub-estudi comparatiu amb 26 casos no-dissociats (no-DC; MYC-R/LMO2⁻). No es van observar diferències significatives en les dades clínicopatològiques però, en quant a les dades de supervivència, els DC presentaven, de manera significativa, una 5a-OS major que els no-DC, és a dir, que malgrat tenir MYC-R, aquells casos que expressaven LMO2 tenien un millor pronòstic.

De manera anàloga, addicionalment, es va estudiar l'expressió de mRNA de MYC i LMO2 per tècniques qPCR en 8 casos de què disposàvem de material congelat i es va obtenir una relació MYC:LMO2 de cada cas. Els pacients amb relacions majors tenien pitjor OS (entre 1 i 12 mesos, tots ells eren HGBL-DH/TH). De manera contrària, els que tenien una relació menor eren llargs supervivents. Aquests resultats són de gran interès doncs, s'han identificat casos que, malgrat presentar MYC-R, tenen millor pronòstic i són els que no perden expressió de LMO2. Una possible explicació a aquest fet és la relació de LMO2 amb els mecanismes de la inestabilitat genòmica. En el treball de Parvin S *et al.* es demostra, utilitzant línies cel·lulars de DLBCL, que en les cèl·lules de DLBCL^{LMO2+} una de les vies de reparació del DNA, la via de la recombinació homòloga (HR), és deficient, facilitant que cèl·lules tumorals genèticament alterades per l'efecte de la quimioteràpia no puguin reparar-se, resultant més sensibles al tractament (Parvin S, 2019). Aquest és un fet que podria explicar per què hi ha casos que malgrat presentar MYC-R tenen una evolució diferent.

L'absència de **LMO2 també és útil pel diagnòstic de BL** i diferenciar-los d'altres LBCL com els BLL-11q. En l'estudi de González-Farré *et al.* van observar que la expressió de LMO2 es detectava en pràcticament la meitat dels casos BLL-11q, fet que permetria diferenciar-los del BL (González-Farré B, 2019). En els treballs que constitueixen aquesta tesi, en les sèries de casos examinades, l'expressió de LMO2 en els BL és molt baixa (1/46, 0/21 i 0/20 respectivament). Aquestes dades reproduïxen els resultats obtinguts en els estudis de GEP prèviament comentats (Dave SS, 2006) (Hummel M, 2006) així com en els principals estudis

d'expressió proteica ([Figura 16, Annex](#)) (Natkunam Y Z. S., 2007) (Agostinelli C, 2012).

4.2 Futures línies de recerca i altres consideracions

Les futures línies de recerca estan adreçades a avaluar la reproductibilitat dels nostres resultats amb diferents laboratoris. La nostra idea és veure si la interpretació dels resultats es reproduïx entre laboratoris en diferents situacions: reproductibilitat entre laboratoris en la interpretació immunohistoquímica del material produït en un centre; reproductibilitat dels resultats dels nostres treballs en el material produït i interpretat en diferents laboratoris.

Tanmateix, volem estudiar amb més profunditat el valor pronòstic de MYC i LMO2 a nivell de RNAm utilitzant tècniques sobre teixir fresc i parafinat. Ens agradaria també aprofundir sobre el paper de LMO2 en els mecanismes d'inestabilitat genòmica i resposta a fàrmacs potencialment útils.

Ens ha interessat també avaluar la presència de alteracions citogenètiques de LMO2 en una sèrie de LBCL. De fet ja tenim resultats però no han estat inclosos en els treballs publicats.

5. Conclusions

1. La pèrdua d'expressió immunohistoquímica de LMO2, estudiat tant amb el clon 1A9-1 com amb el SP51, prediu la presència de reordenaments del gen *MYC* en limfomes B agressius, i és una tècnica robusta.
2. Aquesta capacitat predictora és especialment útil en limfomes B agressius CD10⁺ o amb un perfil immunofenotípic GCB, caracteritzat amb l'algoritme de Hans.
3. Ambdós clons de LMO2 reconeixen la presència de *MYC*-R millor que l'estudi immunohistoquímic de *MYC*, particularment, també en els casos CD10⁺.
4. Els resultats obtinguts han estat superiors en estudiar casos de manera prospectiva sobre seccions completes de teixit, recomanant per tant la incorporació del marcador com part del panell rutinari utilitzat en la caracterització immunohistoquímica habitual dels LBCL.
5. L'expressió de LMO2, tant a nivell de mRNA com proteic a través de la determinació immunohistoquímica aporta informació pronòstica en els LBCL.
6. L'estudi immunohistoquímic de LMO2 és útil per a l'estudi de limfomes, com el BL i diferenciar-los d'altres entitats, com el limfoma *Burkitt-like* amb aberracions del cromosoma 11q (BLL-11q).

6. Bibliografia

- Adhikary S, E. M. (2005). Transcriptional regulation and transformation by MYC proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6(8), 635-645.
- Agarwal R, L. S. (2016). Role of immunohistochemistry in the era of genetic testing in MYC-positive aggressive B-cell lymphomas: a study of 209 cases. *J Clin Pathol*, 69(3), 266-270.
- Agostinelli C, P. J. (2012). Detection of LIM domain only 2 (LMO2) in normal human tissue and haematopoietic and non-haematopoietic tumours using a newly developed rabbit monoclonal antibody. *Histopathology*, 61(1), 33-46.
- Alizadeh AA, E. M. (2000). Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*, 403(6769), 503-511.
- Alizadeh AA, G. A. (2011). Prediction survival in diffuse large B-cell lymphoma based on the expression of 2 genes reflecting tumor and microenvironment. *Blood*, 118(5), 1350-1358.
- Aukema SM, K. M. (2014). Biological characterization of adult MYC-translocation-positive mature B-cell lymphomas others than molecular Burkitt lymphoma. *Haematologica*, 99(4), 726-735.
- Aukema SM, S. R. (2011). Double-hit B-cell lymphoma. *Blood*, 117(8), 2319-2331.
- Baker VV, B. M. (1990). c-MYC amplification in ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, 38(3), 340-342.
- Barrans S, C. S. (2010). Rearrangement of MYC is associated with poor prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated in the era of rituximab. *J Clin Oncol*, 28(20), 3360-3365.
- Barrans SL, F. J. (2004). Strong expression of FOXP1 identifies a distinct subset of diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) patients with poor outcome. *Blood*, 104(9), 2933-2935.
- Barrans SL, O. S. (2002). Rearrangement of the BCL6 locus at 3q27 is an independent poor prognostic factor in nodal diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol*, 117(2), 322-332.
- Basso K, D.-F. R. (2015). Germinal centres and B cell lymphomagenesis. *Nat Rev Immunol*, 15(3), 172-184.
- Beà S. (2004). Clinicopathologic significance and prognostic value of chromosomal imbalances in diffuse large B-cell lymphomas. *J Clin Oncol*, 22, 3498-3508.
- Bellan C, L. S. (2005). Immunoglobulin gene analysis reveals 2 distinct cells of origin for EBV-positive and EBV-negative Burkitt lymphomas. *Blood*, 106(3), 1031-1036.
- Bertrand P, B. C. (2007). Mapping of MYC breakpoints in 8q24 rearrangements involving non-immunoglobulin partners in B-cell lymphomas. *Leukemia*, 21(3), 515-523.
- Bittenbring JT, A. B. (2014). 25-OH-vitamin D deficiency impairs rituximab-mediated cellular cytotoxicity and is associated with an inferior outcome of elderly DLBCL patients treated with rituximab. *J Clin Oncol*, 32(29), 3242-3248.
- Blancato J, S. B. (2004). Correlation of amplification and overexpression of the c-myc oncogene in high-grade breast cancer: FISH, in situ hybridisation and immunohistochemical analyses. *Br J Cancer*, 90(8), 1612-1619.
- Boehm T, F. L. (1991). The rhombotin family of cysteine-rich LIM-domain oncogenes: distinct members are involved in T-cell translocations to

- human chromosomes 11p15 and 11p13. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88(10), 4367-4371.
- Bono P, T. L. (2003). Elevated serum endostatin is associated with poor outcome in patients with non-Hodgkin lymphoma. *Cancer*, 97(11), 2767-2775.
- Bornkamm, G. (2009). Epstein-Barr virus and the pathogenesis of Burkitt's lymphoma: more questions than answers. *Int J Cancer*, 124(8), 1745-1755.
- Boxer LM, D. C. (2001). Translocations involving c-MYC and c-myc function. *Oncogene*, 20(40), 5595-5610.
- Brar N. (2020) LIM domain only 2 (LOM2) expression distinguishes T-lymphoblastic leukemia/lymphoma from indolent T-lymphoblastic proliferations. *Histopathology*, 77(6): 984-988.
- Cai Q, M. L. (2015). MYC-driven aggressive B-cell lymphomas: biology, entity, differential diagnosis and clinical management. *Oncotarget*, 6(36), 38591–38616.
- Calado DP, S. Y. (2012). The cell-cycle regulator c-MYC is essential for the formation and maintenance of germinal centers. *Nat Immunol*, 13(11), 1092-1100.
- Campo E, S. S. (2011). The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood*, 117(19), 5019-5032.
- Campo, E. (2017). Pathology and classification of aggressive mature B-cell lymphomas. *Hematol Onco*, 35(S1), 80-83.
- Campuzano-Zuluaga G, C.-L. M.-F. (2013). Frequency and extent of CD30 expression in diffuse large B-cell lymphoma and its relation to clinical and biologic factors: a retrospective study of 167 cases. *Leuk Lymphoma*, 54(11), 2405-2411.
- Capello D, V. U. (2000). Distribution and pattern of *BCL-6* mutations throughout the spectrum of B-cell neoplasia. *Blood*, 95(2), 651-659.
- Caron G, L. G. (2009). CXCR4 expression functionally discriminates centroblasts versus centrocytes within human germinal center B cells. *J Immunol*, 182(12), 7595-7602.
- Chambers, J., & Rabbitts, T. H. (2015). LMO2 at 25 years: a paradigm of chromosomal translocations proteins. *Open Biol*, 5(6), 150062
doi:10.1098/rsob.150062.
- Chapuy B. (2018). Molecular subtypes of diffuse large B cell lymphoma are associated with distinct pathogenic mechanism and outcomes. *Nat Med*, 24, 679-690.
- Chisholm KM, B. C. (2015). Expression profiles of MYC protein and MYC gene rearrangement in lymphomas. *Am J Surg Pathol*, 39(3), 294-303.
- Choi SY, K. S. (2011). Aggressive B cell lymphomas of the gastrointestinal tract: clinicopathologic and genetic analysis. *Virchow Arch*, 459(5), 495-502.
- Choi WW, W. D. (2009). A new immunostain algorithm classifies diffuse large B-cell lymphoma into molecular subtypes with high accuracy. *Clin Cancer Res*, 15(17), 5494-5502.
- Colomo L, L.-G. A. (2003). Clinical impact of the differentiation profile assessed by immunophenotyping in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*, 101(1), 78-84.

- Cook JR, A. N.-S. (2014). Clinical significance of MYC expression and/or 'high grade' morphology in non-Burkitt, diffuse aggressive B-cell lymphomas: a SWOG S9704 correlative study. *Am J Surg Pathol*, 38(4), 494-501.
- Copie-Bergman C, C.-D. P. (2015). MYC-IG rearrangements are negative predictors of survival in DLBCL patients treated with immunochemotherapy: a GELA/LYSA study. *Blood*, 126(22), 2466-2474.
- Cubedo E, G. A.-C.-C.-G. (2012). Identification of LMO2 transcriptome and interactome in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*, 119(23), 5478-5491.
- Dave SS, F. K. (2006). Molecular diagnosis of Burkitt's Lymphoma. *N Engl J Med*, 354(23), 2431-2442.
- Davis RE, B. K. (2001). Constitutive nuclear factor kappaB activity is required for survival of activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma cells. *J Exp Med*, 194(12), 1861-1874.
- De Jong D, V. B. (1988). Activation of the c-MYC oncogene in a precursor-B-cell blast crisis of follicular lymphoma, presenting as composite lymphoma. *N Engl J Med*, 318(21), 1373-1378.
- Deming SL, N. S. (2000). C-MYC amplification in breast cancer: a meta-analysis of its occurrence and prognostic relevance. *Br J Cancer*, 83(12), 1688-1695.
- Dogan A, B. E. (2000). CD10 and BCL-6 expression in paraffin sections of normal lymphoid tissue and B-cell lymphomas. *Am J Surg Pathol*, 24(6), 846-852.
- Dominguez-Sola D, V. G. (2012). The proto-oncogene MYC is required for selection in the germinal center and cyclic reentry. *Nat Immunol*, 13(11), 1083-1091.
- Drake MT, M. M. (2010). Vitamin D insufficiency and prognosis in non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol*, 28(27), 4191-4198.
- Durnick DK, L. M. (2010). Expression of LMO2 is associated with t(14;18)/IGH-BCL2 fusion but not BCL6 translocations in diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Clin Pathol*, 134(2), 278-281.
- Dyhalo KS, L. C. (2013). Immunoarchitectural patterns of germinal center antigens including LMO2 assist in the differential diagnosis of marginal zone lymphoma vs follicular lymphoma. *Am J Clin Pathol*, 140(2), 149-154.
- El Omari K, H. S. (2011). Structure of the leukemia oncogene LMO2: implications for the assembly of a hematopoietic transcription factor complex. *Blood*, 117(7), 2146-2156.
- Engelhard M, B. G. (1997). Subclassification of diffuse large B-cell lymphoma according to the Kiel classification: distinction of centroblastic and immunoblastic lymphomas is a significant prognostic risk factor. *Blood*, 89(7), 2291-2297.
- Ennishi D, J. A. (2018). Double-hit gene expression signature defines a distinct subgroup of germinal center B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol*, 37(3), 190-201.
- Evens AM, S. L. (2010). Hypoxia inducible factor 1(alpha) expression predicts superior survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *J Clin Oncol*, 28(6), 1017-1024.
- Fernandez PC, F. S. (2003). Genomic targets of the human c-MYC protein. *Genes Dev*, 17(9), 1115-1129.

- Filip D, M. M. (2020). The role of MYC in the transformation and aggressiveness of 'indolent' B-cell malignancies. *Leuk Lymphoma*, 61(3), 510-524.
- Filipits M, J. U. (2002). Cyclin D3 is a predictive and prognostic factor in diffuse large B-cell lymphoma. *Clin Cancer Res*, 8(3), 729-733.
- Foot NJ, D. R. (2011). Fluorescence in situ hybridisation analysis of formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections in the diagnostic work-up of non-Burkitt high grade B-cell non-Hodgkin's lymphoma: a single centre's experience. *J Clin Pathol*, 64(9), 802-808.
- Gauwerky CE, H. J. (1988). Pre-B-cell leukemia with a t(8;14) and t(14;18) translocation is preceded by follicular lymphoma. *Oncogene*, 2(15), 431-435.
- Gebauer N, B. V. (2015). Oncogenic MYD88 mutations are rare events in double-hit B-cell lymphomas. *Acta Haematol*, 113-115.
- Gebauer N, B. V. (2015). TP53 mutations are frequent events in double-hit B-cell lymphomas with MYC and BCL2 but not MYC and BCL6 translocations. *Leuk Lymphoma*, 56(1), 179-185.
- Gomes M, P. F. (2014). Diffuse large B-cell lymphoma: biological prognostic factors and treatment with anti-CD20 antibody. *Arq Med*, 28(4), 104-112.
- González-Farré B, R.-Z. J.-V. (2019). Burkitt-like lymphoma with 11 aberration: a germinal center-derived lymphoma genetically unrelated to Burkitt Lymphoma. *Haematologica*, 104(9), 1822-1829.
- Green TM, N. O.-M. (2012). High levels of nuclear MYC protein predict the presence of MYC rearrangement in diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Surg Pathol*, 36(4), 612-619.
- Green TM, Y. K. (2012). Immunohistochemical double-hit score is a strong predictor of outcome in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone. *J Clin Oncol*, 30(28), 3460-3467.
- Gutierrez-Garcia G, C.-S. T. (2011). Gene-expression profiling and not immunophenotypic algorithms predicts prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with immunochemotherapy. *Blood*, 117(18), 4836-4843.
- Hammond SM, C. S. (2005). Negative regulatory elements are present in the human LMO2 oncogene and may contribute to its expression in leukemia. *Leuk Res*, 29(1), 89-97.
- Hans CP, W. D. (2004). Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood*, 103(1), 275-282.
- Harada S, S. R. (1999). Molecular and immunological dissection of diffuse large B cell lymphoma: CD5+ and CD5- with CD10+ groups may constitute clinically relevant subtypes. *Leukemia*, 13(9), 1441-1447.
- Hoffman B. (2008). Apoptotic signaling by c-MYC. *Oncogene*. 27, 6462-6472.
- Horn H, S. A. (2015). Diffuse large B-cell lymphoma of immunoblastic type are a major reservoir for MYC-IGH translocations. *Am J Surg Pathol*, 39(1), 61-66.
- Horn H, Z. M. (2013). MYC status in concert with BCL2 and BCL6 expression predicts outcome in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*, 121(12), 2253-2263.

- Hu S, X.-M. Z. (2013). CD30 expression defines a novel subgroup of diffuse large B-cell lymphoma with favorable prognosis and distinct gene expression signature: a report from the International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program Study. *Blood*, 121(14), 2715-2724.
- Hu S, X.-M. Z. (2013). MYC/BCL2 protein coexpression contributes to the inferior survival of activated B-cell sub-type of diffuse large B-cell lymphoma and demonstrates high-risk gene expression signatures: a report from the International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program. *Blood*, 121(20), 4021-4031.
- Hummel M, B. S. (2006). A biologic definition of Burkitt's lymphoma from transcriptional and genomic profiling. *N Engl J Med*, 354(23), 2419-2430.
- Hwang YY, L. F. (2011). Atypical Burkitt's lymphoma transforming from follicular lymphoma. *Diagn Pathol*, 6, 63.
- Ichikawa A, K. T. (1997). Mutations of the *p53* gene as a prognostic factor in aggressive B-cell lymphoma. *N Engl J Med*, 337(8), 529-534.
- Ichiki A, C. J. (2017). Clinicopathological analysis of 320 cases of diffuse large B-cell lymphoma using the Hans classifier. *J Clin Exp Hematop*, 57(2), 54-63.
- Intlekofer AM, Y. A. (2014). Precision therapy for lymphoma--current state and future directions. *Nat Rev Clin Oncol*, 11(10), 585-596.
- Iqbal J, G. T. (2007). Distinctive patterns of BCL6 molecular alterations and their functional consequences in different subgroups of diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia*, 21(11), 2332-2343.
- Iqbal J, N. V. (2006). BCL2 expression is a prognostic marker for the activated B-cell-like type of diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol*, 24(6), 961-968.
- Jerkeman M, A. P.-S. (2002). Prognostic implications of *BCL6* rearrangement in uniformly treated patients with diffuse large B-cell lymphoma: a nordic lymphoma group study. *Int J Oncol*, 20(1), 161-165.
- Jin J, C. L. (2018). Expression of hypoxia-inducible factor-1a predicts benefit from rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone in diffuse large B-cell lymphoma. *Int J Clin Exp Pathol*, 11(9), 4472-4482.
- Johnson NA, S. G. (2012). Concurrent expression of MYC and BCL2 in diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone. *J Clin Oncol*, 30(28), 3452-3459.
- Johnson NA, S. K. (2009). Lymphomas with concurrent *BCL2* and *MYC* translocations: the critical factors associated with survival. *Blood*, 114(11), 2273-2279.
- Johnson NA. (2016). Functional and clinical impact of *MYC* mutations in diffuse large B cell lymphomas. *Transl Cancer Res*, 5(suppl2), S257-S260.
- Kadrmas JL, B. M. (2004). The LIM domain: from the cytoskeleton to the nucleus. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5(11), 920-931.
- Klaproth K, W. T. (2010). Advances in understanding of MYC-induced lymphomagenesis. *Br J Haematol*, 149(4), 484-497.
- Kluk MJ, H. C. (2016). MYC immunohistochemistry to identify MYC-driven B-cell lymphomas in clinical practice. *Am J Clin Pathol*, 145(2), 166-179.

- Kobayashi H, I. M. (2011). Concurrent development of "Burkitt-like" lymphoma and *BCL-2*-rearranged low-grade B cell lymphoma sharing the same germinal center origin. *Int J Hematol.*, 93(1), 112-117.
- Korkolopoulou P, V. T. (2016). Recent Advances in aggressive large B-cell lymphomas: a comprehensive review. *Adv Anat Pathol*, 23(4), 202-243.
- Kramer MH, H. J. (1996). Clinical significance of Bcl2 and p53 protein expression in diffuse large B-cell lymphoma: a population-based study. *J Clin Oncol*, 14(7), 2131-2138.
- Kuo TC, S. A. (2007). Repression of BCL-6 is required for the formation of human memory B cells in vitro. *J Exp Med*, 204(4), 819-830.
- Landsburg DJ, F. M. (2016). Sole rearrangement but not amplification of *MYC* is associated with a poor prognosis in patients with diffuse large B cell lymphoma and B cell lymphoma unclassifiable,. *Br J Haematol*, 175(4), 631-640.
- Le Gouill S, T. O. (2007). The clinical presentation and prognosis of diffuse large B-cell lymphoma with t(14;18) and 8q24/c-*MYC* rearrangement. *Haematologica*, 92(10), 1335-1342.
- Leroy K, H. C. (2002). *p53* gene mutations are associated with poor survival in low and low-intermediate risk diffuse large B-cell lymphomas. *Ann Oncol*, 13(7), 1108-1115.
- Leucci E, C. M. (2008). *MYC* translocation-negative classical Burkitt lymphoma cases: an alternative pathogenetic mechanism involving miRNA deregulation. *J Pathol*, 216(4), 440-450.
- Li L, L. Y. (2018). Prognostic significances of overexpression *MYC* and/or *BCL2* in R-CHOP-treated diffuse large B-cell lymphoma: A Systematic review and meta-analysis. *Sci Rep*, 8(1), 6267.
- Li S, D. P. (2016). *MYC/BCL6* double-hit lymphoma (DHL): a tumour associated with an aggressive clinical course and poor prognosis. *Histopathology*, 68(7), 1090-1098.
- Li S, L. P. (2012). B-cell lymphomas with *MYC/8q24* rearrangements and *IGH@BCL2/t(14;18)(q32;q21)*: an aggressive disease with heterogeneous histology, germinal center B-cell immunophenotype and poor outcome. *Mod Pathol*, 25(1), 145-156.
- Li S, S. A. (2015). B-cell lymphoma with concurrent *MYC* and *BCL2* abnormalities other than translocations behave similarly to *MYC/BCL2* double-hit lymphoma. *Mod Pathol*, 28, 208-217.
- Li ZM, H. J. (2012). High Ki-67 expression in diffuse large B-cell lymphoma patients with non-germinal center subtypes indicates limited survival benefit from R-CHOP therapy. *Eur J Haematol*, 88(6), 510-517.
- Lin P, D. T. (2012). Prognostic value of *MYC* rearrangement in cases of B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between diffuse large B-cell lymphoma and Burkitt lymphoma. *Cancer*, 118(6), 1566-1573.
- Lindsley RC, L. A. (2012). Biology of double-hit B cell lymphomas. *Curr Opin Hematol*, 19(4), 299-304.
- Lossos C, B. S. (2014). *LMO2* and *BCL6* are associated with improved survival in primary central nervous system lymphoma. *Br J Haematol*, 165(5), 640-648.

- Lossos IS, A. A. (2003). HGAL is a novel interleukin-4-inducible gene that strongly predicts survival in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*, 101(2), 433-440.
- Lossos IS, C. D. (2004). Prediction of survival in diffuse large-B-cell lymphoma based on the expression of six genes. *N Engl J Med*, 350(18), 1828-1837.
- Lossos IS, J. K. (2001). Expression of a single gene, BCL-6, strongly predicts survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*, 98(4), 945-951.
- Lu TX, F. L. (2015). *MYC* or *BCL2* copy number aberration is a strong predictor of outcome in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Oncotarget*, 6(21), 18374-18388.
- Maartense E, K. M. (2004). 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*, 45(1), 101-107.
- Malumbres R, C. J. (2008). Paraffin-based 6 gene-model predicts outcome in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with R-CHOP. *Blood*, 111(12), 5509-5514.
- Martin-Subero JI, O. M. (2005). Amplification of *IGH/MYC* fusion in clinically aggressive *IGH/BCL2*-positive germinal center B-cell lymphomas. *Genes Chromosomes Cancer*, 43(4), 414-423.
- Mateyak MK, O. A. (1999). c-MYC regulates cyclin D-Cdk4 and -Cdk6 activity but affects cell cycle progression at multiple independent points. *Mol Cell Biol*, 19(7), 4672-4683.
- Menter T. (2015) Diagnostic utility of the germinal center-associated markers GCET1, HGAL, and LMO2 in hematolymphoid neoplasms. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 23, 491-498.
- Meyer N, P. L. (2008). Reflecting on 25 years with MYC. *Nat Rev Cancer*, 8(12), 976-990.
- Meyer PN, F. K. (2011). Immunohistochemical methods for predicting cell of origin and survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab. *J Clin Oncol*, 29(2), 200-207.
- Miller TP, G. T. (1994). Prognostic significance of the Ki-67 associated proliferative antigen in aggressive non-Hodgkin's lymphoma: a prospective Southwest Oncology Group trial. *Blood*, 83(6), 1460-1466.
- Miyaoka M, K. Y. (2017). Clinicopathological and genomic analysis of double-hit follicular lymphoma: comparison with high-grade B-cell lymphoma with *MYC* and *BCL2* and/or *BCL6* rearrangements. *Mod Pathol*, 00, 1-14.
- Natkunam Y, F. P. (2008). LMO2 protein expression predicts survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with anthracycline-based chemotherapy with and without rituximab. *J Clin Oncol*, 26(3), 447-454.
- Natkunam Y, Z. S. (2007). The oncoprotein LMO2 is expressed in normal germinal center B cells and in human B-cell lymphomas. *Blood*, 109(4), 1636-1642.
- Ngo VN, Y. R. (2011). Oncogenically active *MYD88* mutations in human lymphoma. *Nature*, 470(7332), 115-119.
- Nguyen L, P. P. (2017). The role of c-MYC in B-cell lymphomas: diagnostic and molecular aspects. *Genes (Basel)*, 8(4), E116.

- Nicolaidis C, F. G. (1998). Diffuse large B-cell lymphomas: identification of prognostic factors and validation of the international non-Hodgkin's lymphoma prognostic index-A hellenic cooperative oncology group study. *Oncology*, 55(5), 405-415.
- Nigg, E. (2002). Centrosome aberrations: cause or consequence of cancer progression? *Nat Rev Cancer*, 2(11), 815-825.
- Niitsu N, O. M. (2009). Clinical features and prognosis of de novo diffuse large B-cell lymphoma with t(14;18) and 8q24/c-MYC translocations. *Leukemia*, 23(4), 777-783.
- O'Malley DP, A. A. (2015). Practical Applications in Immunohistochemistry: evaluation of diffuse large B-cell lymphoma and related large B-cell lymphomas. *Arch Pathol Lab Med*, 139(9), 1094-1107.
- Osada H, G. G. (1995). Association of erythroid transcription factors: complexes involving the LIM protein RBTN2 and the zinc-finger protein GATA1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92(21), 9585-9589.
- Otsuka M, Y. Y. (2004). Role of CD21 antigen in diffuse large B-cell lymphoma and its clinical significance. *Br J Haematol*, 127(4), 416-424.
- Ott G, R. A. (2013). Understanding MYC-driven aggressive B-cell lymphomas: pathogenesis and classification. *Blood*, 122(24), 3884-3891.
- Ott G, Z. M. (2010). Immunoblastic morphology but not the immunohistochemical GCB/nonGCB classifier predicts outcome in diffuse large B-cell lymphoma in the RICOVER-60 Trial of the DSHNHL. *Blood*, 116(23), 4916-25.
- Parvin S, R.-L. A. (2019). LMO2 confers synthetic lethality to PARP inhibition in DLBCL. *Cancer cell*, 36(3), 237-249.
- Pasqualucci L, D.-F. R. (2015). The genetic landscape of diffuse large B-cell lymphoma. *Semin Hematol*, 52(2), 67-76.
- Pasqualucci L, T. V. (2011). Analysis of the coding genome of diffuse large B-cell lymphoma. *Nat Genet*, 43(9), 830-837.
- Patel JL.(2014). LMO2 (LIM domain only 3) is expressed in a subset of acute myeloid leukaemia and correlates with normal karyotype. *Histopathology*, 64, 226-233.
- Pedersen MO, G. A. (2012). Double-hit *BCL2/MYC* translocations in a consecutive cohort of patients with large B-cell lymphoma-a single centre's experience. *Eur J Haematol*, 89(1), 63-71.
- Pedersen MO, G. A. (2014). *MYC* translocation partner gene determines survival of patients with large B-cell lymphoma with *MYC*- or double-hit *MYC/BCL2* translocations. *Eur J Haematol*, 92(1), 42-48.
- Perry AM, A.-B. Y. (2014). *MYC* and *BCL2* protein expression predicts survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab. *Br J Haematol*, 165(3), 382-391.
- Perry AM, C. D. (2013). B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between diffuse large B-cell lymphoma and Burkitt lymphoma: study of 39 cases. *Br J Haematol*, 162(1), 40-49.
- Pescarmona E, D. S. (1997). Pathogenic and clinical implications of Bcl-6 and Bcl-2 gene configuration in nodal diffuse large B-cell lymphomas. *J Pathol*, 183(3), 281-286.
- Pillai RK, S. M. (2013). Double-hit B-cell lymphoma with *BCL6* and *MYC* translocations are aggressive, frequently extranodal lymphomas distinct

- from *BCL2* double-hit B-cell lymphomas. *Am J Surg Pathol*, 37(2), 323-332.
- Raess PW, M. S. (2018). *MYC* immunohistochemical and cytogenetic analysis are required for identification of clinically relevant aggressive B cell lymphoma subtypes. *Leuk Lymphoma*, 59, 1391-1398.
- Riedell PA, S. S. (2018). Double hit and double expressors in lymphoma: definition and treatment. *Cancer*, 124(24), 4622-4632.
- Ristamaki R, J. H. (1994). Serum CD44 in malignant lymphoma: an association with treatment response. *Blood*, 84(1), 238-243.
- Rosenthal A, Y. A. (2017). High grade B-cell lymphoma with rearrangements of *MYC* and *BCL2* and/or *BCL6*: double hit and triple hit lymphomas and double expressing lymphoma. *Blood Rev*, 31(2), 37-42.
- Rosenwald A, W. G. (2002). The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large B-cell lymphoma. *N Engl J Med*, 346(25), 1937-1947.
- Rosenwald A B.S.-B. (2019). Prognostic significance of *MYC* rearrangements and Translocation partner in diffuse large B-cell lymphoma: a study by the Lunenburg Lymphoma Biomarker Consortium, *J Clin Oncol*, 37, 3359-3368.
- Royer-Pokora B, L. U. (1991). *TTG-2*, a new gene encoding a cysteine-rich protein with the LIM motif, is overexpressed in acute T-cell leukemia with the t(11;14)(p13;q11). *Oncogene*, 6(10), 1887-1893.
- Sáez A, S. E.-B. (1999). p27KIP1 is abnormally expressed in diffuse large B-cell lymphomas and is associated with an adverse clinical outcome. *Br J Cancer*, 80(9), 1427-1434.
- Salles G, d. J. (2011). Prognostic significance of immunohistochemical biomarkers in diffuse large B-cell lymphoma: a study from the Lunenburg Lymphoma Biomarker Consortium. *Blood*, 117(26), 7070-7078.
- Sarkozy C, T.-G. A. (2015). Double-hit and double-protein-expresson lymphomas: aggressive and refractory lymphomas. *Lancet Oncol*, 16(15), e555-e567.
- Savage KJ, J. N.-N. (2009). *MYC* gene rearrangements are associated with a poor prognosis in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with R-CHOP chemotherapy. *Blood*, 114(17), 3533-3537.
- Schmitz R. (2018). Genetics and pathogenesis of diffuse large b-cell lymphoma. *N Engl J Med*, 378, 1398-1407.
- Scott DW, W. G.-J. (2014). Determining cell-of-origin subtypes of diffuse large B-cell lymphoma using gene expression in formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *Blood*, 123(8), 1214-1217.
- Sehn LH, B. B. (2007). The revised International Prognostic Index (R-IPI) is a better predictor of outcome than the standard IPI for patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *Blood*, 109(5), 1857-1861.
- Sesques P, J. N. (2017). Approach to the diagnosis and treatment of high-grade B-cell lymphomas with *MYC* and *BCL2* and/or *BCL6* rearrangements. *Blood*, 129(3), 280-288.
- Sewastianik T, P.-S. M. (2014). *MYC* deregulation in lymphoid tumors: molecular mechanisms, clinical consequences and therapeutic implications. *Biochim Biophys Acta*, 1846(2), 457-467.

- Shams, T. (2011). High expression of LMO2 in Hodgkin, Burkitt and germinal center diffuse large B cell lymphoma. *J Egypt Natl Canc Inst*, 23(4), 147-153.
- Shipp MA, R. K. (2002). Diffuse large B-cell lymphoma outcome prediction by gene-expression profiling and supervised machine learning. *Nat Med*, 8(1), 68-74.
- Smith SM, A. J. (2010). The impact of MYC expression in lymphoma biology: beyond Burkitt lymphoma. *Blood Cells Mol Dis.*, 45(4), 317-323.
- Snuderl M, K. O.-B. (2010). B-cell lymphomas with concurrent *IGH-BCL2* and *MYC* rearrangements are aggressive neoplasms with clinical and pathologic features distinct from Burkitt lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Surg Pathol*, 34(3), 327-340.
- Sohn SK, J. J. (2003). Prognostic significance of Bcl-2, Bax, and p53 expression in diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Hematol*, 73(2), 101-107.
- Stasik CJ, N. H. (2010). Increased *MYC* gene copy number correlates with increased mRNA levels in diffuse large B-cell lymphoma. *Haematologica*, 95(4), 597-603.
- Swerdlow SH, C. E. (2016). The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood*, 127(20), 2375-2390.
- Swerdlow SH, C. E. (2017). *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues (Revised 4th edition)*. Lyon, France: IARC.
- Tapia G, L. R.-M. (2011). Immunohistochemical detection of MYC protein correlates with *MYC* gene status in aggressive B cell lymphomas. *Histopathology*, 59(4), 672-678.
- Terol MJ, T. M.-C. (2003). Soluble intercellular adhesion molecule-1 (s-ICAM-1/s-CD54) in diffuse large B-cell lymphoma: association with clinical characteristics and outcome. *Ann Oncol*, 14(3), 467-474.
- Testoni M, K. I. (2011). Gains of *MYC* locus and outcome in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *Br J Haematol*, 155(2), 274-277.
- Thomas LR, T. W. (2011). Proteolytic control of the oncoprotein transcription factor MYC. *Adv Cancer Res*, 110, 77-106.
- Tomita N, T. M. (2009). Clinicopathological features of lymphoma/leukemia patients carrying both *BCL2* and *MYC* translocations. *Haematologica*, 94(7), 935-943.
- Tomita, N. (2011). *BCL2* and *MYC* dual-hit lymphoma/leukemia. *J Clin Exp Hematop*, 51(1), 7-12.
- Tzankov A. (2014). Rearrangements of *MYC* gene facilitate risk stratification in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with rituximab-CHOP. *Mod Pathol*, 27, 958-971.
- Valera A, L.-G. A.-S. (2013). MYC protein expression and genetic alterations have prognostic impact in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with immunochemotherapy. *Haematologica*, 98(10), 1554-1562.
- Valge-Archer V, F. A. (1998). The LMO1 and LDB1 proteins interact in human T cell acute leukaemia with the chromosomal translocation t(11;14)(p15;q11). *Oncogene*, 17(24), 3199-3202.
- Victora GD, e. a. (2012). Identification of human germinal center light and dark zone cells and their relationship to human B-cell lymphomas. *Blood*, 120(11), 2240-2248.

- Visco C, L. Y.-M. (2012). Comprehensive gene expression profiling and immunohistochemical studies support application of immunophenotypic algorithm for molecular subtype classification in diffuse large B-cell lymphoma: a report from the International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium. *Leukemia*, 26(9), 2103-2113.
- Wadman IA, O. H. (1997). The LIM-only protein Lmo2 is a bridging molecule assembling an erythroid, DNA-binding complex which includes the TAL1, E47, GATA-1 and LDB1-NLI proteins. *EMBO J*, 16(11), 3145-3157.
- Wang XJ, M. L. (2015). MYC cytogenetic status correlates with expression and has prognostic significance in patients with MYC/BCL2 protein double-positive diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Surg Pathol*, 39(9), 1250-1258.
- Warren AJ, C. W. (1994). The oncogenic cysteine-rich LIM domain protein RBTN2 is essential for erythroid development. *Cell*, 78(1), 45-57.
- Wilder RB, R. M. (2002). International prognostic index-based outcomes for diffuse large B-cell lymphomas. *Cancer*, 94(2), 3083-3088.
- Wilson WH, Y. R. (2015). Targeting B cell receptor signaling with ibrutinib in diffuse large B-cell lymphoma. *Nat Med*, 21(8), 922-926.
- Winter JN, L. S. (2010). Expression of p21 protein predicts clinical outcome in DLBCL patients older than 60 years treated with R-CHOP but not CHOP: a prospective ECOG and Southwest Oncology Group correlative study on E4494. *Clin Cancer Res*, 16(8), 2435-2442.
- Wright G, T. B. (2003). A gene expression-based method to diagnose clinically distinct subgroups of diffuse large B-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100(17), 9991-9996.
- Wright GW. (2020). A probabilistic classification tool for genetic subtypes of diffuse large B cell lymphoma with therapeutic implications. *Cancer Cell*, 37(4), 551-568.e14.
- Wu L, X. Y. (2015). High frequency of cryptic chromosomal rearrangements involving the LMO2 gene in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*, 100(6), e233-e236.
- Xu-Monette ZY, D. Q.-M. (2016). Clinical and Biologic Significance of MYC Genetic Mutations in De Novo Diffuse Large B-cell Lymphoma. *Clin Cancer Res*, 22(14), 3593-3605.
- Yamada Y, P. R. (2000). The oncogenic LIM-only transcription factor LMO2 regulates angiogenesis but not vasculogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97(1), 320-324.
- Yamada Y, W. A. (1998). The T cell leukemia LIM protein LMO2 is necessary for adult mouse hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95(7), 3890-3895.
- Younes SF, B. A. (2010). Immunoarchitectural patterns in follicular lymphoma: efficacy of HGAL and LMO2 in the detection of the interfollicular and diffuse components. *Am J Surg Pathol*, 34(9), 1266-1276.
- Younes SF, B. A. (2011). The efficacy of HGAL and LMO2 in the separation of lymphomas derived from small B cell in nodal and extranodal sites, including the bone marrow. *Am J Clin Pathol*, 135(5), 697-708.
- Zhang A, O. K. (1999). Prognostic clinicopathologic factors, including immunologic expression in diffuse large B-cell lymphomas. *Pathol Int*, 49(12), 1043-1052.

- Zhang Y, W. J. (2015). Prognostic and clinicopathological value of survivin in diffuse large B-cell lymphoma. A meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*, 94(36), e1432.
- Ziepert M, H. D. (2010). Standard International Prognostic index remains a valid predictor of outcome for patients with aggressive CD20+ B-cell lymphoma in the rituximab era. *J Clin Oncol*, 28(14), 2372-2380.

7. Annex

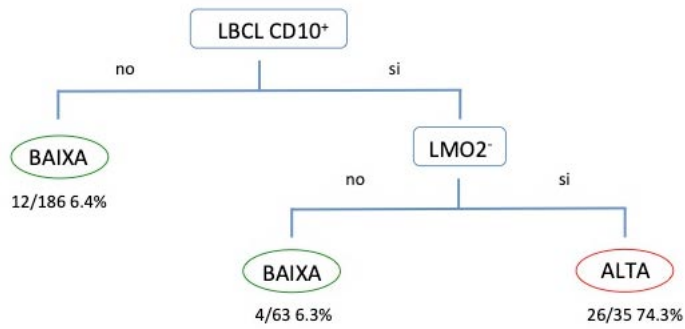


Figura 14. Arbre indicant la probabilitat de reordenament de *MYC* en LBCL basat en l'expressió immunohistoquímica de CD10 i LMO2. Els nombres indiquen els casos *MYC*-R/total de casos en el braç.

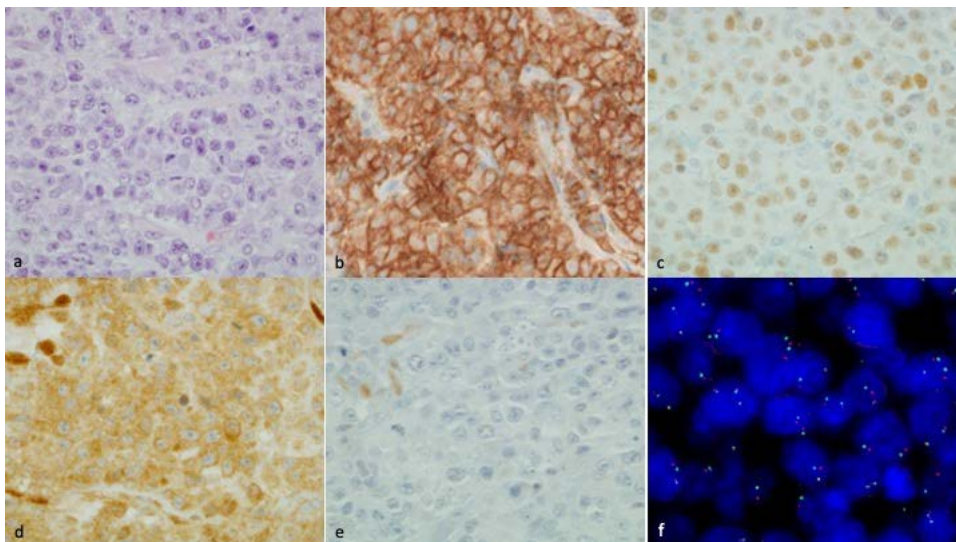


Figura 15. A. Cas exemple: DLBCL, CD10⁺ LMO2⁻ amb translocació de *MYC*. a. Morfologia de la lesió en la hematoxilina-eosina. b. CD10. C. Expressió de *MYC* per immunohistoquímica. D. Expressió de LMO2 per immunohistoquímica, clon 1A9-1. E. Expressió de LMO2 per immunohistoquímica, clon SP51. F. FISH de *MYC* split.

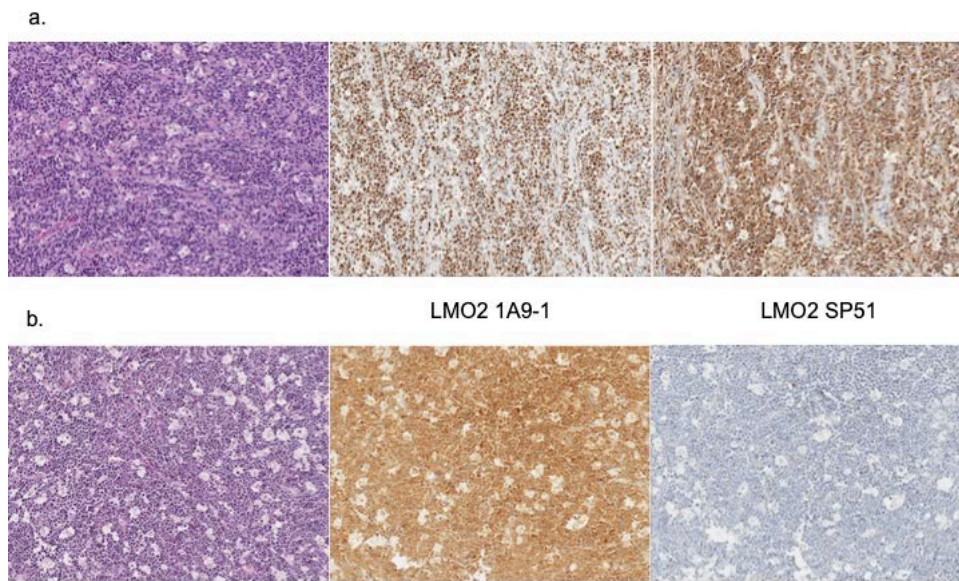


Figura 16. Utilitat de l'expressió de LMO2 per diferenciar BLL-11q i BL. Expressió de LMO2 en el BLL-11q (a) i en BL (b). Els BL es caracteritzen per absència d'expressió de LMO2, fet que permetria el diagnòstic diferencial entre ambdues entitats.

AGRAÏMENTS

Arribats a aquest punt, ara és el moment d'agrair a totes aquelles persones, a les que a moltes considero amigues, per haver-me ajudat a arribar fins aquí. Espero no deixar-me'n cap.

En primer lloc dono les gràcies al director de la tesi, per la seva paciència infinita. Totes aquelles explicacions i hipòtesis que inicialment em semblaven 'capsetes' al cap aïllades, finalment han connectat i plasmat en aquesta tesi. Gràcies per compartir els coneixements de manera planera i amena, per l'ajuda i per la confiança dipositada, gràcies Lluís.

Als tutors de la tesi, el Dr. Alameda qui inicialment em va embarcar en aquest viatge, pel seu recolçament ara en la distància i al Dr. Mate, pel suport en l'etapa final d'aquest treball.

A l'equip de Citogenètica, la Dra. Blanca Espinet, Dra. Marta Salido i la Dra. Anna Puiggrós, a Maria Rodríguez i Carme Melero, pel seu gran treball sense el qual aquesta feina d'investigació tampoc hauria estat completa. Per les hores que em vau dedicar en ensenyar-me a valorar les tècniques d'hibridació en talls de TMA.

Als coautors de la resta d'institucions, per la col·laboració en compartir casos i fer, amb això, una gran feina d'equip.

Als companys del Departament de Patologia, patòlegs, tècnics, administratius, a tots per acollir-me com una família. Als patòlegs per ensenyar-me el que sé de la professió que considero la més bonica del món i que m'apassiona. Al Dr. Serrano per la seva acollida el dia que vaig anar per primera vegada al servei i presentar-me la resta d'equip, on algunes cares ja m'eren familiars: el 'Coro', la Belén i la Mar. Després, poc a poc ens hem anat convertint en més que companys: Javi, Núria, Pep, Carlos, Montse, Lara, Lola i Laia. A la Laura, la meva R gran, amb qui la vida m'ha portat a compartir despatx i a la Jèssica, sempre allà per si el 'macro' d'una 'peça' se'm resistia. A la Raquel també vull agrair-li aquelles tardes de residència que, entre desesperació i riure, vam compartir; per ser una gran co-R. Al Massó, al Riera i al Chus, per la vostra ajuda i ànims, que encara rebo.

A Cata, por los grandes ratos pasados, académicos y no tan académicos, esas risas eran terapéuticas.

A la meva altra 'família', la del Taulí, sobretot a la Dra. Marta Larrosa, per la seva amistat en la distància i recolzar-me en el moment del 'fins després'. I al Dr. Raimon Sanmartí, de l'Hospital Clínic, per ensenyar-me a ser metgessa.

Encara que ja els hi he donat les gràcies, ho torno a fer: gràcies Ingrid, Aroa i Lluís, per entendre que alguns moments no els he pogut compartir amb vosaltres. No patiu, no tinc pensat fer cap altra residència més.

A mi padre, del que podría decir muchas cosas pero lo resumiré con esta frase: papá eres el mejor padre del mundo. Y finalmente, a mi madre, te quiero, eres ejemplo de tenacidad y dedicación.

