

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA

HEMATOLOGÍA



UNIVERSIDAD
DE SALAMANCA

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL



TESIS DOCTORAL

**Caracterización del Linfoma Folicular y
predicción de la transformación histológica a
linfoma agresivo:
Mecanismos moleculares e implicaciones pronósticas**

María García Álvarez

Salamanca, 2019

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA

HEMATOLOGÍA



UNIVERSIDAD
DE SALAMANCA

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL



TESIS DOCTORAL

**Caracterización del Linfoma Folicular y
predicción de la transformación histológica a
linfoma agresivo:**

Mecanismos moleculares e implicaciones pronósticas

María García Álvarez

Directores: Marcos González Díaz, Ramón García Sanz y

Miguel Alcoceba Sánchez

D. MARCOS GONZÁLEZ DÍAZ, Doctor en Medicina, Catedrático de Universidad y Jefe de Servicio de Hematología del Hospital Clínico Universitario de Salamanca.

D. RAMÓN GARCÍA SANZ, Doctor en Medicina, Profesor Asociado de Medicina y Jefe de Sección del Servicio de Hematología del Hospital Clínico Universitario de Salamanca.

D. MIGUEL ALCOCEBA SÁNCHEZ, Doctor en Biología e Investigador del Hospital Clínico Universitario de Salamanca.

CERTIFICAN:

Que el presente trabajo titulado “Caracterización del Linfoma Folicular y Predicción de la Transformación Histológica a Linfoma Agresivo: Mecanismos Moleculares e Implicaciones Pronósticas” realizado por D^a. María García Álvarez bajo su dirección en el Departamento de Medicina, reúne, a su juicio, las condiciones de originalidad y calidad científica requeridas para su presentación y defensa para optar al grado de Doctor en Medicina por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmamos el presente certificado.

En Salamanca, a 15 de mayo de 2019.

Prof. D. Marcos González Díaz

Dr. D. Ramón García Sanz

Dr. D. Miguel Alcoceba Sánchez

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
INTRODUCCIÓN	7
1. FISIOLÓGÍA Y ONTOGÉNESIS DE LA CÉLULA B	9
1.1. Desarrollo de la célula B normal y reacción centro germinal	9
1.1.1. Reordenamiento V(D)J y estructura de BCR	11
1.1.2. Hipermutación somática (HMS)	12
1.1.3. Cambio de clase o isotipo (CSR)	13
2. LINFOMA FOLICULAR	14
2.1. Linfomagénesis y célula de origen del Linfoma Folicular	14
2.1.1. Evento iniciador y desarrollo del LF	15
2.2. Definición, subtipos y localización del LF	17
2.3. Epidemiología y etiología	19
2.4. Criterios diagnósticos y clasificación	20
2.4.1. Histología y clasificación	21
2.4.2. Inmunofenotipo e inmunohistoquímica	23
2.4.3. Pruebas moleculares y citogenéticas/FISH	23
2.5. Características clínicas y estadiaje	24
2.6. Tratamiento	25
2.6.1. Estadio inicial, enfermedad localizada	25
2.6.2. Estadio avanzado, enfermedad generalizada	27
2.6.3. Tratamiento de mantenimiento	28
2.6.4. Tratamiento en segunda línea y sucesivas	30
2.7. Pronóstico del LF	31
2.7.1. Modelos pronósticos al diagnóstico	31
2.7.2. Factores pronósticos dinámicos	32
3. CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA DEL LF	34
3.1. Genes de las Igs	34
3.2. Alteraciones cromosómicas	35
3.3. Mutaciones somáticas	36
3.3.1. Mutaciones en reguladores epigenéticos	38
3.3.2. Mutaciones en moduladores de la respuesta inmune	39
3.3.3. Mutaciones que afectan a la vía JAK-STAT	40
3.3.4. Mutaciones que afectan a la vía BCR/NF-κB	40
3.3.5. Mutaciones en genes involucrados en apoptosis y ciclo celular	41
3.3.6. Mutaciones en factores de transcripción	41
4. LINFOMA FOLICULAR TRANSFORMADO	43

4.1. Progresión, transformación y evolución clonal	43
4.2. Definición de transformación y epidemiología	44
4.3. Célula de origen y patogénesis de la TH	46
4.4. Factores asociados a TH	47
4.4.1. Factores de riesgo clínicos	47
4.4.2. Factores de riesgo biológicos	48
4.5. Pronóstico y tratamiento del LFt	52
5. BIBLIOGRAFÍA	54
HIPÓTESIS DE TRABAJO	67
OBJETIVOS.....	71
MATERIAL y MÉTODOS	75
1. SUJETOS DE ESTUDIO	77
1.1. Caracterización de la serie global	77
1.2. Transformación histológica (TH).....	79
1.3. Distribución de los pacientes	79
2. METODOLOGÍA GENÉTICO MOLECULAR	82
2.1. Revisión histológica e inmunofenotípica.....	82
2.2. Técnicas citogenéticas: FISH	83
2.3. Extracción y control de calidad del ácido desoxirribonucleico (ADN)	83
2.3.1. ADN de biopsias de adenopatía o masa tumoral en fresco	83
2.3.2. ADN de muestras de MO, SP y otros tejidos.....	83
2.3.3. ADN de tejido parafinado (FFPE)	84
2.3.4. Purificación del ADN para las técnicas de secuenciación de nueva generación.....	84
2.3.5. Cuantificación y control de calidad del ADN.....	84
2.4. Amplificación del ADN mediante PCR estándar	85
2.4.1. Aspectos generales	85
2.4.2. Amplificación del reordenamiento V(D)J	86
2.4.3. <i>Nested</i> PCR para t(14;18)(q32;q31).....	87
2.5. Análisis de fragmentos (GeneScan)	88
2.5.1. Aspectos generales	88
2.5.2. Detección de clonalidad	89
2.5.3. Detección de la t(14;18)(q32;q31)	90
2.6. Secuenciación convencional del ADN (Sanger)	90
2.6.1. Aspectos generales	90
2.6.2. Secuenciación Sanger del reordenamiento V(D)J.....	92
2.7. Secuenciación de nueva generación (<i>Next Generation Sequencing</i> , NGS).....	93

2.7.1. Aspectos generales.....	93
2.7.2. Estudios de NGS realizados: <i>Amplicones</i>	103
2.7.3. Estudios de NGS realizados: <i>Captura</i>	105
2.7.4. Anotación, filtrado e interpretación de variantes	109
2.7.5. Comparación de ambas tecnologías: amplicones vs captura	111
3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO Y DEFINICIÓN DE VARIABLES	112
4. BIBLIOGRAFÍA.....	113
RESULTADOS	119
<u>CAPÍTULO 1. ESTUDIO DEL REORDENAMIENTO DE LOS GENES DE LA CADENA PESADA DE LAS INMUNOGLOBULINAS EN EL LINFOMA FOLICULAR Y SU PAPEL EN LA TRANSFORMACIÓN HISTOLÓGICA A LINFOMA AGRESIVO.</u>	123
<u>CAPÍTULO 2. CARACTERIZACIÓN GENÓMICA DE PACIENTES CON LINFOMA FOLICULAR. IDENTIFICACIÓN DE ALTERACIONES GÉNICAS ASOCIADAS CON LA EVOLUCIÓN CLÍNICA Y APLICACIÓN DEL M7-FLIPI EN NUESTRA SERIE.....</u>	151
<u>CAPÍTULO 3. ESTUDIO MOLECULAR DE LA PROGRESIÓN Y TRANSFORMACIÓN HISTOLÓGICA DEL LINFOMA FOLICULAR A LINFOMA AGRESIVO. POSIBLES MODELOS DE EVOLUCIÓN CLONAL EN BASE A LA EXPERIENCIA DE UN SOLO CENTRO.</u>	181
DISCUSIÓN GENERAL.....	207
CONCLUSIONES	217
DIFUSIÓN DE RESULTADOS.....	221
ANEXOS	225
ANEXO I - Glosario de términos de NGS	227
ANEXO II - Cuantificación con <i>KAPA Library Quantification kit</i>	231
ANEXO III - Artículo aceptado en <i>Blood Cancer Journal</i>	237

ABREVIATURAS

18F- FDG	18[F]fluorodesoxiglucosa
μl	Microlitro
μM	Micromolar
AA	Aminoácido
ABC	Célula B activada (subtipo LDCBG, <i>Activated-B cell</i>)
aCGH	<i>Array comparative genomic hybridization</i>
ADDC	Citotoxicidad mediada por anticuerpos
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AID	<i>Activation-induced deaminasa enzyme</i>
aUPD	<i>Acquired uniparental disomy</i>
β2-m	β2-microglobulina
BCR	Receptor de célula B
C	Constante
CAR	Campo de alta resolución
CDR	<i>Complementarity determining región</i>
CDS	Secuencia codificante (<i>Coding sequence</i>)
CG	Centro germinal
CGB	Centro germinal B (subtipo LDCBG)
CMF	Citometría de flujo
CNA	<i>Copy number alterations</i>
CPC	Clon progenitor común (<i>Common progenitor cell</i>)
CR30	<i>Complete response at 30 months</i>
CSR	Cambio de clase de isotipo (<i>Class-switch recombination</i>)
CXCR4	<i>CXC-chemokine receptor 4</i>
CXCR5	<i>CXC-chemokine receptor 5</i>
D	Diversity
DL	Zona clara del CG (<i>Light zone</i>)
dNTPs	Deoxinucleósido trifosfato
DZ	Zona oscura del CG (<i>Dark zone</i>)
ECOG	<i>Eastern Cooperative Oncology Group</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EMR	Enfermedad mínima residual

Fab	Región variable de la Ig
Fc	Región constante de la Ig
FFPE	Tejido parafinado (<i>Formalin-fixed paraffin-embedded tissue</i>)
FISH	<i>Fuorescent in situ hybridization</i>
FLIPI	Índice pronóstico internacional del LF
FLLC	<i>FL-like cells</i>
FR	<i>Framework region</i>
Gb	Gigabase
GLSG	<i>German Low-Grade Lymphoma Study Group</i>
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i>
HSM	Hipermutación somática
HMSA	Hipermutación somática aberrante
icr	<i>Intermediate cluster region</i>
Ig	Inmunoglobulina
IgH	Genes de la cadena pesada de las Igs (<i>Immunoglobulin heavy locus</i>)
IGHD	<i>Immunoglobulin heavy diversity</i>
IGHJ	<i>Immunoglobulin heavy joining</i>
IGHV	<i>Immunoglobulin heavy variable</i>
IgL	Genes de la cadena ligera de las Igs (<i>Immunoglobulin light locus</i>)
IGV	<i>Integrative Genomics Viewer</i>
IHQ	Inmunohistoquímica
Indel	Inserción o delección
IPI	Índice Pronóstico Internacional
IQT	Inmunoquimioterapia
ISFN	<i>In situ follicular neoplasia</i>
J	<i>Joining</i>
kb	Kilobase
LCM	Linfoma de células del manto
LDCBG	Linfoma difuso de célula B grande
LDH	Enzima lactato deshidrogenasa
LEZM	Linfoma esplénico de zona marginal
LLC	Leucemia linfática crónica

LNH	Linfoma no Hodgkin
LF	Linfoma folicular
LFt	Linfoma folicular transformado
LOH	<i>Loss of heterozygosity</i>
MBR	<i>Major breakpoint region</i>
mcr	<i>Minor breakpoint cluster region</i>
mM	Milimolar
MO	Médula ósea
MSR	<i>MiSeq Reporter</i>
MW	Macroglobulinemia de Waldenström
NGS	Secuenciación de nueva generación (<i>Next generation sequencing</i>)
NR	No respuesta
OB	Obinutuzumab asociado a bendamustina
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAAF	Punción aspiración con aguja fina
pb	<i>Par de bases</i>
PBS	Tampón fosfato salino o buffer fosfato salino (<i>Phosphate buffered saline</i>)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PET	Tomografía por emisión de positrones
pmol	Picomol
POD24	<i>Progression of disease within 24 months</i>
PRC2	<i>Polycomb repressor complex 2</i>
preB	Precursor de célula B
PRIMA-PI	Índice pronóstico PRIMA
QT	Quimioterapia
R	Rituximab
RAG	Genes activadores de recombinación (<i>Recombination activating gene</i>)
RB	Rituximab asociado a Bendamustina
RC	Respuesta completa
R-CHOP	Rituximab asociado a ciclofosfamida, doxorrubicina, vincristina y prednisona
R-CVP	Rituximab asociado a ciclofosfamida, vincristina y prednisona
R-ESHAP	Rituximab asociado a etopósido, prednisolona, ARA-C y cis-platino

R-FM	Rituximab asociado a fludarabinamitoxantrona
RP	Respuesta parcial
RSS	Secuencia señal de recombinación (<i>Recombination signal sequence</i>)
RT	Radioterapia
RTA	<i>Real time analysis</i>
SD	Desviación estándar
SG	Supervivencia global
SLE	Supervivencia libre de enfermedad
SLFT	Supervivencia libre de fracaso terapéutico
SLP	Supervivencia libre de progresión
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
SNV	<i>Single nucleotide variant</i>
SP	Sangre periférica
TC	Tomografía computerizada
TH	Transformación histológica
TIR	<i>Toll/IL-1 Receptor domain</i>
TPH	Trasplante de progenitores hematopoyéticos
TRC	Terminación reversible cíclica
TTT	Tiempo hasta la transformación (<i>Time to transformation</i>)
UTR	Región no traducida (<i>Untranslated region</i>)
V	<i>Variability</i>
V(D)J	<i>Variable (Diversity) Joining</i>
VHB	Virus de la hepatitis B
VHC	Virus de la hepatitis C
VIH	Virus de inmunodeficiencia humano

INTRODUCCIÓN

1. FISIOLÓGÍA Y ONTOGÉNESIS DE LA CÉLULA B

1.1. Desarrollo de la célula B normal y reacción centro germinal

El desarrollo u ontogenia de la célula B o linfocito B comprende dos fases, una fase independiente de antígeno, que tiene lugar en la médula ósea (MO, órgano linfoide central o primario), y una fase dependiente de antígeno, que tiene lugar en los órganos linfoides periféricos o secundarios.

Este proceso comienza con el reordenamiento de los genes de las inmunoglobulinas (Ig), tanto de la cadena pesada (IGH) como ligera (IGL), en la MO dando lugar a la expresión de una estructura específica del receptor de la célula B (BCR) o Ig de superficie no secretable. Estas células con expresión de un BCR funcional y no autorreactivo son células B *naïve*, maduras e inmunocompetentes, que abandonarán la MO, mientras que aquellos con expresión fallida de BCR entrarán en apoptosis.¹ Cada célula B *naïve* expresa un BCR específico en su superficie que reconoce una estructura antigénica concreta, pudiendo participar en respuestas inmunes de tipo humoral. La célula B activada viaja por el torrente sanguíneo hasta los órganos linfoides secundarios, donde interacciona con células T específicas de antígeno o linfocitos T CD4 (respuesta inmune adaptativa) y sufre una expansión clonal en estructuras específicas denominadas centro germinal (CG).²

Los CGs son estructuras muy organizadas, en las cuales varios tipos celulares (células dendríticas foliculares, células T o macrófagos, entre otros) interaccionan entre sí para coordinar la producción y selección de células B con expresión o liberación de anticuerpos de elevada afinidad, pudiendo ser diferenciadas a células B de memoria o células plasmáticas como resultado de la reacción CG.²⁻⁶ Estas estructuras son funcionalmente polarizadas y están formadas por una zona oscura (DZ, *dark zone*), donde se encuentran casi exclusivamente células B en proliferación (centroblastos) sometidas a un proceso de remodelación del gen de las Igs denominado hipermutación somática (HMS), y una zona clara (LZ, *light zone*), formada por las células B no proliferantes seleccionadas en base a su afinidad por el antígeno, que experimentan cambio de clase de isotipo (CSR, *class-switch recombination*) dando lugar a células B con Ig de superficie o BCR de alta afinidad (centrocito) (Figura 1).⁶⁻⁸ Esta polarización del CG es posible gracias a la expresión de dos receptores de quimiocinas, *CXC-chemokine receptor 4* (CXCR4) y 5 (CXCR5), restringidos a la DZ y LZ, respectivamente. La ausencia de estas moléculas implica estructuras desorganizadas del CG, impidiendo la circulación de la célula B entre las DZ y LZ.⁹

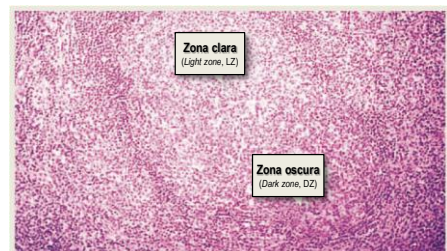


Figura 1. Estructura histológica del centro germinal (CG). Figura adaptada de *ESMO: Lymphomas. Essentials for clinicians* (Davies A. 2016, capítulo 1: p.1-6).

Por otro lado, los CGs son estructuras dinámicas y temporales, de manera que la maduración de la célula B no sigue una vía unidireccional entre ambas zonas. Este proceso consiste en una recirculación entre la DZ y LZ con el fin someterse a rondas adicionales de división celular y HMS, aumentando así la afinidad por el antígeno. El proceso por el cual la célula B es seleccionada para sobrevivir y proliferar en base a su elevada afinidad por el antígeno recibe el nombre de maduración de la afinidad,⁵ y finaliza en la diferenciación de estas células B del CG en precursores de célula B de memoria o plasmablastos, que finalmente madurarán a células B de memoria y células plasmáticas secretoras de Igs, respectivamente (Figura 2).^{2,6}

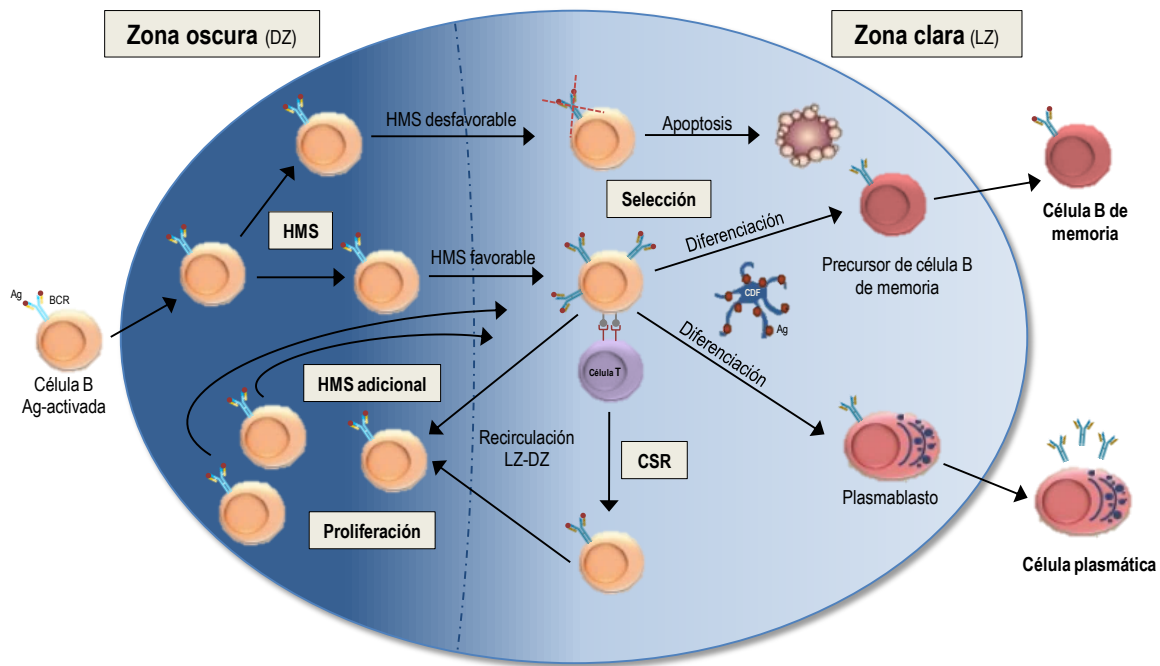


Figura 2. Dinámica de la reacción centro germinal (CG) y selección de inmunoglobulinas (Igs) de alta afinidad. En esta figura se representa la fase del desarrollo de la célula B dependiente de antígeno que tiene lugar en los órganos linfoides secundarios. El proceso comienza con la entrada de la célula B activada por antígeno (Ag) al ganglio linfático, donde será sometida a una expansión clonal acoplada a la introducción de cambios puntuales en los genes que codifican la región variable de la cadena pesada de la Ig (genes IGHV). Este proceso recibe el nombre de hipermutación somática (HMS). A continuación, la célula B migra de la zona oscura (DZ) a la zona clara (LZ) del CG, donde su receptor antigénico será modificado a través de la interacción con células T y células dendríticas foliculares (CDF), mejorando su unión al Ag. Las células con HMS e Igs desfavorables no serán seleccionadas y entrarán en apoptosis, mientras que aquellas favorables serán seleccionadas pudiendo ser sometidas a cambio de isotipo (CSR) o entrar de nuevo a la DZ para someterse a nuevas rondas de HMS y proliferación. Este proceso es la base de la generación de células B de memoria y células plasmáticas que expresan o producen Ig de alta afinidad, respectivamente.

Tanto el desarrollo como la maduración a la que se somete la célula B en el CG hacen que disponga de una fisiología característica y diferente al resto de subpoblaciones celulares. Se trata de células con alta tasa de proliferación, muy susceptibles al proceso de apoptosis permitiendo una eliminación rápida de aquellas con

mutaciones somáticas desfavorables, y sometidas a un elevado control molecular, que involucra coordinación a varios niveles permitiendo la migración dinámica y cambios en el estado celular.²

Con todo esto podemos concluir que la diversidad y variabilidad de estas Igs se consigue a través de la combinación de a) reordenamiento V(D)J, con deleciones e inserciones aleatorias durante el reordenamiento b) HMS, en la fase de maduración de la afinidad, y c) CSR, consiguiendo especificidad efectora.¹⁰

1.1.1. Reordenamiento V(D)J y estructura de BCR

La célula B presenta en su superficie receptores antigénicos denominados Igs, cuya dotación genética se encuentra en todas las células pero sólo se expresan en la célula B. Estas moléculas proteicas son codificadas como consecuencia del reordenamiento de los genes de las Igs o reordenamiento V(D)J que, como se ha descrito previamente, tiene lugar en etapas tempranas del desarrollo en la MO. Estos genes se encuentran localizados en varios *loci* cromosómicos: el gen de la cadena pesada o IGH en el brazo largo del cromosoma 14 (14q32), el gen de la cadena ligera κ en el brazo corto del cromosoma 2 (2p12) y el de la cadena ligera λ en el brazo largo del cromosoma 22 (22q11).¹¹⁻¹⁴ Cada uno de estos genes está compuesto por distintos segmentos génicos que se reordenan para codificar la estructura básica de la Ig, formada por dos cadenas pesadas y dos ligeras, ambas idénticas entre sí, ligadas por puentes disulfuro. Tanto las cadenas pesadas como las ligeras poseen dos regiones bien diferenciadas, una región constante (extremo carboxi-terminal) y una región variable (extremo amino-terminal). Además, funcionalmente, se puede distinguir una región con función efectora (Fc), compuesta por dominios constantes, y una región encargada de mediar la unión antígeno-receptor (Fab), compuesta por un dominio variable y otro constante (Figura 3A).¹⁵ La región constante de la Ig se codifica a partir de los segmentos génicos C, mientras que la región variable se codifica a partir de la combinación o ensamblaje de varios segmentos génicos V (*V*ariability) y J (*J*oining). En el caso de la cadena pesada, existe un grupo adicional de segmentos génicos denominados D (*D*iversity) que no están presentes en los genes de las cadenas ligeras. Esto explica que, aunque la función de la Ig dependa de la acción conjunta de ambos tipos de cadenas, haya evidencias que sugieran una mayor contribución a la diversidad y especificidad de las Igs por parte de la región amino-terminal de la molécula de IgH.^{13;16}

El reordenamiento V(D)J está regulado por un complejo enzimático, codificado por un grupo de genes denominados genes activadores de recombinación (RAG), donde *RAG1* y *RAG2* codifican las enzimas esenciales y específicas de la célula B. Estas enzimas reconocen y producen roturas de ADN en unas secuencias concretas que ayudan a guiar la recombinación o reordenamiento entre segmentos génicos denominadas secuencia señal de recombinación (RSS, *recombination signal sequence*), localizadas flanqueando los distintos segmentos génicos.¹³ Este proceso generalmente comienza con la unión de un segmento D con un

segmento J, seguido de la unión del segmento D-J a un segmento V en el caso de IGH, hablando entonces de reordenamiento IGHV-(IGHD)-IGHJ (Figura 3B). En el caso de las cadenas ligeras se reordena únicamente un segmento V con uno J. Las secuencias intermedias entre los segmentos reordenados se eliminan mediante una escisión circular, formando horquillas de ADN.^{14;17}

Este proceso que tiene lugar en la célula B está cuidadosamente regulado y ordenado permitiendo generar una gran diversidad de combinaciones con pocos segmentos génicos (diversidad combinatoria), aproximadamente de 2×10^6 moléculas de Ig distintas.¹⁴ Esto permite, ahorrando material genético, conseguir un reordenamiento específico y característico de cada célula B, siendo prácticamente nula la probabilidad de encontrar dos células B con el mismo BCR.^{17;18}

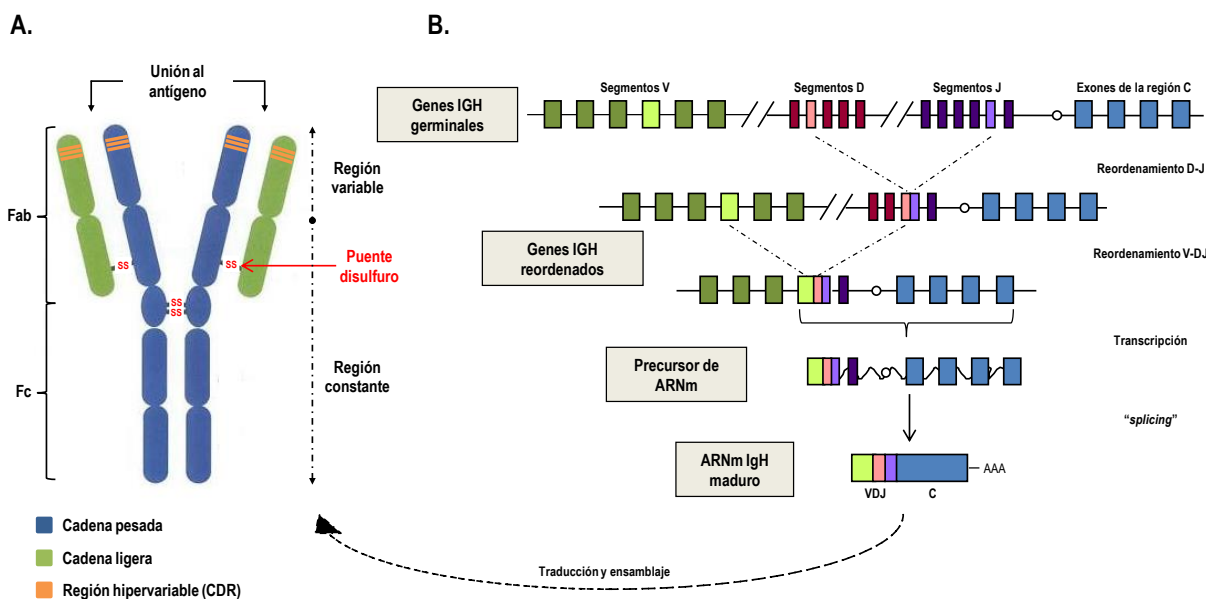


Figura 3. Estructura de la molécula de Ig y reordenamiento de los segmentos V(D) de su cadena pesada. (A) Estructura típica y esquemática de la Ig compuesta por dos cadenas pesadas (azul) y dos ligeras (verde), idénticas dos a dos, unidas entre sí por puentes disulfuro (-SS-). Cada una de las cadenas está formada a su vez por una región constante y una región variable, en la cual se encuentran las regiones hipervariables (CDR, naranja). La región Fab de la Ig será la encargada del reconocimiento antigénico, mientras que la región Fc determinará la función efectora de la Ig. **(B)** Diagrama esquemático del reordenamiento aleatorio de los segmentos génicos V(D) de la cadena pesada de las Igs. Los segmentos génicos V (verde), D (rojo) y J (morado), así como los exones de la región constante (azul), se representan mediante rectángulos coloreados. En primer lugar se produce el reordenamiento de un segmento D con un segmento J (D-J) y a continuación el segmento DJ se reordena con un segmento V (V-DJ). La transcripción y splicing de los genes IGH reordenados dará lugar a un ARNm maduro que será traducido dando lugar a la molécula de Ig básica.

1.1.2. Hipermutación somática (HMS)

Una vez en los órganos linfoides secundarios, la región variable de la Ig (Fab) es sometida a HMS en la DZ del CG, proceso que, desde el punto de vista funcional, representa la base molecular de la maduración de afinidad de la Ig. Este proceso consiste en la modificación del ADN introduciendo principalmente cambios de un

solo nucleótido, aunque también pequeñas inserciones y deleciones,¹⁹ y comienza 150 pares de bases (pb) secuencia abajo del promotor de la región variable, extendiéndose alrededor de 2 kb.¹⁶ Estas mutaciones no son aleatorias, ya que existen regiones con mayor tasa de mutación, y requieren la actividad de la enzima AID (*activation-induced deaminasa*) que lleva a cabo la desaminación de citidinas. Estos cambios activan la maquinaria de reparación de errores en el ADN dando lugar a la introducción de mutaciones en esta región.^{2;16;20} Las células B que hayan adquirido mutaciones desfavorables o erróneas serán eliminadas por vía apoptótica.²

Dentro de la región variable de las Ig se encuentran tres zonas denominadas “hipervariables o CDR (*complementarity determining region*)” que a su vez están flanqueadas por otras regiones muy conservadas denominadas “*framework* o FR”. Entre las regiones CDR, sometidas a tasas elevadas de HMS, CDR1 y CDR2 están compuestas por secuencias génicas V, mientras que CDR3 está formada por la zona de unión de los segmentos V(D)J. Por ello, la región CDR3 es la más variable y además responsable de la especificidad de la Ig, siendo su secuencia única y específica de cada célula B.

1.1.3. Cambio de clase o isotipo (CSR)

La enzima AID, además de ser responsable de la HMS, contribuye a mediar el cambio de isotipo o *switching* de las Igs, que tiene lugar en la LZ del CG. Este proceso consiste en el reordenamiento de determinadas secuencias de los segmentos génicos de la región constante de IGH, introduciendo roturas doble hebra en las regiones de cambio o *switch*.²¹ La fusión de estas regiones da lugar al reordenamiento de la región constante consiguiendo Igs con funciones efectoras diferentes y especializadas en función del tipo de isotipo, manteniendo la misma especificidad por el antígeno. Por tanto, podemos hablar de 5 clases distintas de Igs (Figura 4) en función del tipo de cadena pesada que presenten: M (cadena μ), G (cadena γ), A (cadena α), E (cadena ϵ) y D (cadena δ).^{22;23} Una vez que ocurre el CSR, las células B pueden regresar a la DZ para someterse de nuevo a HMS o bien diferenciarse en células de memoria o células plasmáticas y salir del CG.

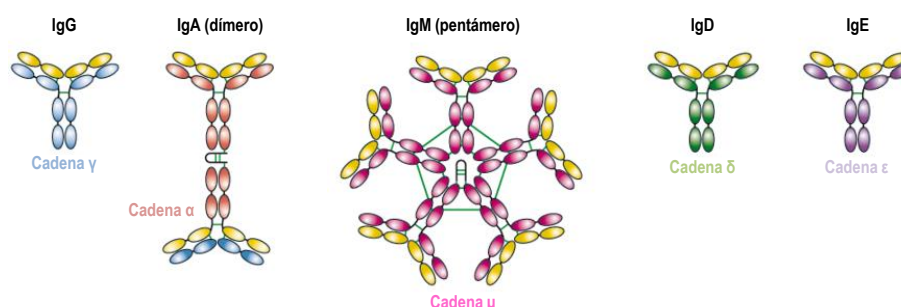


Figura 4. Representación esquemática de las 5 clases de Ig. Figura adaptada de *ESMO: Lymphomas. Essentials for clinicians* (Davies A. 2016, capítulo 1: p.1-6).

2. LINFOMA FOLICULAR

2.1. Linfomagénesis y célula de origen del Linfoma Folicular

La compleja maquinaria que regula y hace posible la fisiología de la célula B CG es susceptible de alteraciones génicas que pueden desencadenar procesos anómalos dando lugar al desarrollo de linfomas B derivados del CG. Por tanto, las vías involucradas en la reacción CG parecen estar implicadas en la linfomagénesis o patogénesis de la mayoría de los linfomas B CG. Las células tumorales que originan estos linfomas presentan características propias de la célula B CG que no están presentes en otros tipos celulares, como la presencia de HMS y CSR en la región variable de la cadena pesada de sus Igs de superficie o BCRs, reteniendo así características claves de su contrapartida normal. Estas células tumorales tienen bloqueada su capacidad para seguir diferenciándose a células B de memoria o plasmáticas, y son sometidas a una expansión clonal incontrolada, manteniendo el estadio de diferenciación en el que tuvo lugar la transformación maligna.²⁴ Esta es la razón por la cual todas las células tumorales derivadas de una antecesora presentan el mismo reordenamiento V(D)J, formando así una población tumoral clonal predominante sobre el resto de linfocitos B. El estudio molecular de este reordenamiento predominante ayuda a establecer el diagnóstico de clonalidad en la mayoría de los linfomas B, siendo una herramienta muy útil en la práctica clínica.

La enzima AID, implicada tanto en HMS como en el CSR, se expresa tanto en la célula B CG normal como en la derivada de tumores, estando por tanto implicada en el desarrollo de linfomas B CG de manera indirecta.²⁵ Durante el desarrollo de la célula B CG, en algunas ocasiones la actividad de AID se descontrola actuando sobre zonas del genoma fuera de sus regiones diana (*off-target*), principalmente en proto-oncogenes, dando lugar a lo que se denomina hipermutación somática aberrante (HMSA). El mecanismo por el cual la enzima AID actúa *off-target* de los genes de las Igs no está claro, aunque hay evidencias de que perfiles epigenéticos, alteraciones en la fosforilación de la proteína o *enhancers* de la célula B puedan estar implicados.^{2,26-30} Por otro lado, algunos estudios sugieren que esta enzima también está implicada en el reordenamiento cromosómico causante de muchas de las traslocaciones típicas de los linfomas B CG que, con frecuencia, reordenan el gen IGH con un proto-oncogen, consiguiendo una activación constitutiva del mismo.³¹⁻³³

El linfoma folicular (LF) es un tipo de linfoma B CG que surge a partir de la transformación maligna de la célula B CG que, en casi el 100% de los casos, ha sufrido HMS (Figura 5). El LF presenta un patrón de crecimiento de tipo folicular, compartiendo la célula de origen características morfológicas, inmunofenotípicas y moleculares con su contrapartida normal (centrocitos y centroblastos).³⁴ Además, esta célula de origen expresa en su superficie marcadores típicos de la célula B como son CD19, CD20, CD22 y CD79a, y algunos más

concretos del CG como CD10 y BCL6.³⁵ En el origen del LF tiene gran importancia la HMSA, siendo los genes diana más frecuentes en el LF y otros linfomas derivados del CG *BCL6*, *MYC*, *PAX5*, *PIM1*, *SOCS1* y *BCL2*.³⁶⁻⁴⁰ Por otro lado, el microambiente juega un papel importante en la linfomagénesis del LF, existiendo una dependencia por parte de la célula tumoral de células T CD4, monocitos, macrófagos y células del estroma que liberan los factores de crecimiento necesarios para la linfomagénesis.⁴¹ Por tanto, el LF comprende una mezcla de centrocitos y centroblastos neoplásicos con células no neoplásicas incluyendo células T, células dendríticas foliculares y macrófagos, entre otras células del microambiente, que promueven la supervivencia de la célula B tumoral o neoplásica y la protegen de la muerte celular.⁴²

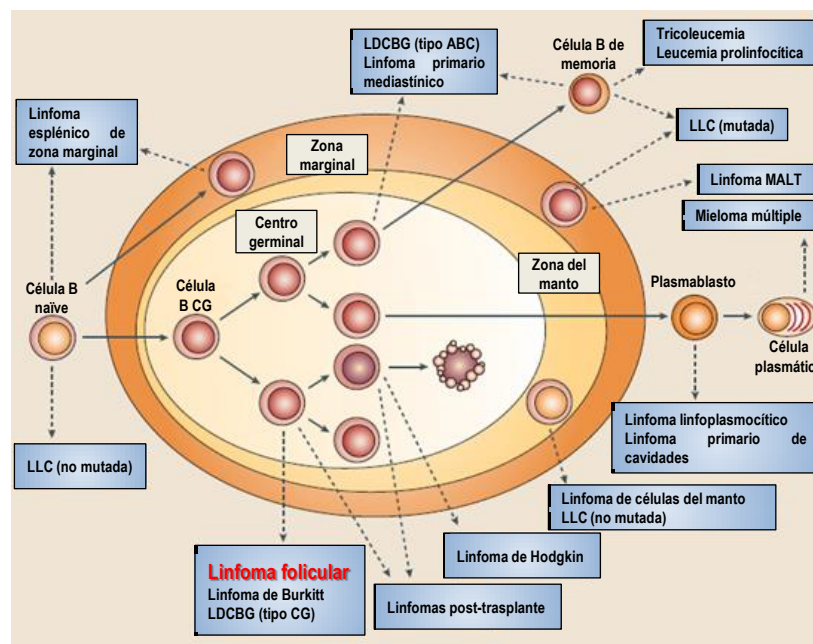


Figura 5. Origen celular de las neoplasias de célula B madura. Figura adaptada de *Mechanisms of B cell lymphoma pathogenesis* (Küppers R. 2005). ABC, célula B activada; CG, centro germinal; LDCBG, linfoma difuso de célula B grande; LLC, leucemia linfática crónica; MALT, tejido linfoide asociado a mucosas.

2.1.1. Evento iniciador y desarrollo del LF

La traslocación recíproca $t(14;18)(q32.3;q21.3)$ es considerada el evento inicial clásico y característico del LF.^{10;43} Esta traslocación da lugar a la yuxtaposición del proto-oncogen *BCL2*, situado en el cromosoma 18, con el *enhancer* del gen *IGH*, en el cromosoma 14.⁴⁴ Tiene lugar en la MO como consecuencia de errores en el reordenamiento V(D)J debidos al mal funcionamiento del complejo enzimático RAG, que produce roturas doble hebra defectuosas en ambos cromosomas o sólo en el cromosoma 14.^{2;45} La $t(14;18)$ está presente en el 85-90% de los casos y tiene como resultado la sobreexpresión constitutiva de la proteína antiapoptótica BCL2, normalmente ausente en este tipo celular, generando células B con el tiempo de vida incrementado. El cromosoma 18 presenta varios puntos de ruptura o *breakpoints*, estando los más frecuentes (70%) agrupados en

una región de aproximadamente 150 pb denominada MBR (*major breakpoint region*). El 30% restante se agrupan en una región 29 kb aguas abajo de MBR, denominada mcr (*minor breakpoint cluster region*), o en icr (*intermediate cluster region*).⁴⁶⁻⁴⁹ En el caso del cromosoma 14, el *breakpoint* se encuentra en los genes J de la región variable de la cadena pesada de las Igs (IGHJ) (Figura 6A).⁵⁰

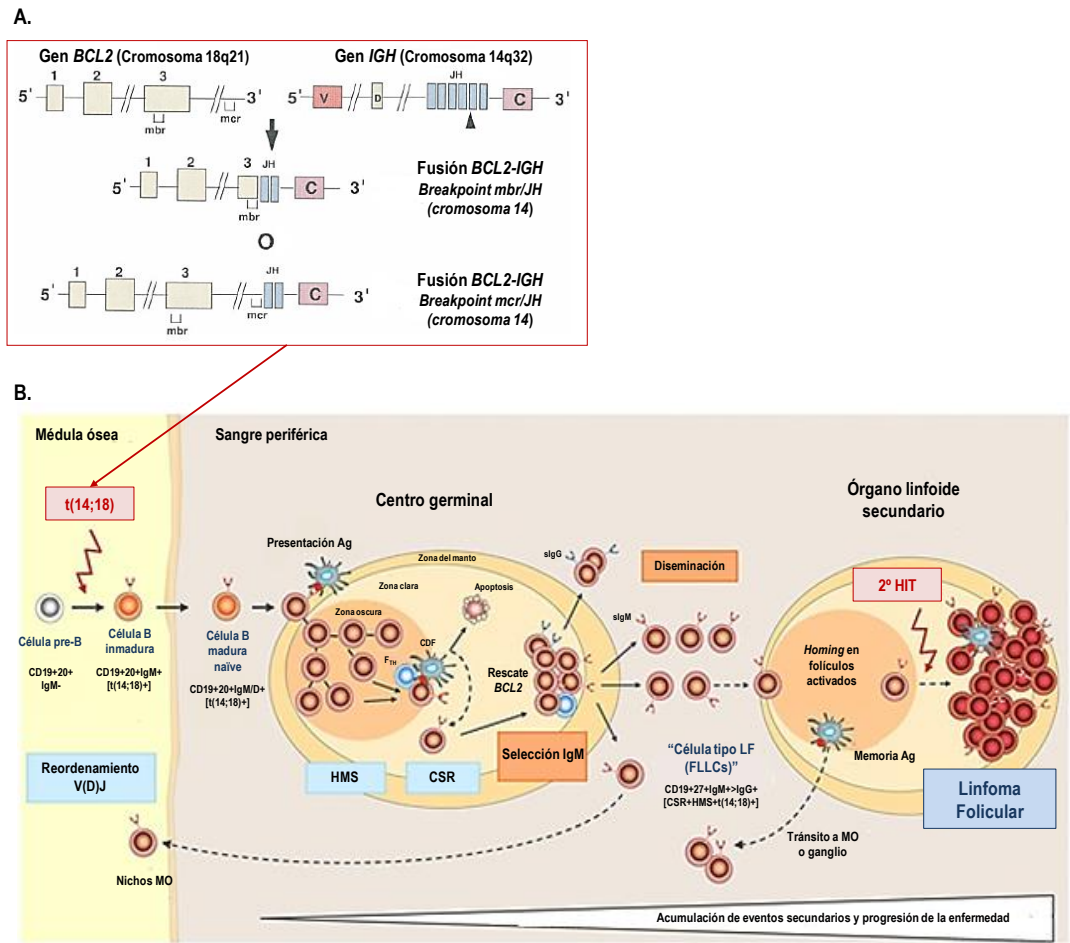


Figura 6. Diagrama esquemático (A) de la traslocación (14;18) y (B) del desarrollo del LF. (A) Figura adaptada de *Molecular diagnosis of B- and T-cell lymphomas: fundamental principles and clinical applications* (Rezuke AN et al. 1997) en la que se representa la t(14;18) que da lugar a la fusión de los genes BCL2 e IGH. Los breakpoints mbr y mcr son los más frecuentes del cromosoma 18, mientras que en el cromosoma 14 el breakpoint es fijo, siempre en la región génica JH (punta de flecha). (B) Figura adaptada de *Pathophysiological aspects of memory B-cell development* (Roulland S et al. 2008) que representa un modelo de patogénesis del LF. Las células B naïve de la médula ósea (MO) adquieren la t(14;18) debido a errores en el reordenamiento V(D)J. Esta célula entra en el centro germinal (CG) donde tiene lugar la reacción CG y, por tanto, será sometida a hipermutación somática (HMS) y a cambio de isotipo (CSR). Una vez aquí, la sobreexpresión del gen antiapoptótico BCL2 como consecuencia de la traslocación aporta una ventaja a la célula B para escapar de vías apoptóticas. Estas células B "tipo LF" salen del CG y viajan a la MO o a órganos linfoides secundarios donde pueden adquirir cambios genéticos adicionales necesarios para la transformación y desarrollo del LF. FLLCs, células tipo LF; IgM, inmunoglobulina M; sIgM, inmunoglobulina M de superficie; sIgG, inmunoglobulina G de superficie.

A pesar de que la t(14;18) es típica del LF, hay un 10-15% de pacientes negativos para esta traslocación que presentan características propias y diferentes al resto, como la ausencia de expresión del marcador de superficie CD10, expresión positiva de IRF4 o alteraciones y reordenamientos que involucran al gen *BCL6*.⁵¹⁻⁵⁵ El

fenotipo molecular de este grupo de pacientes suele ser más próximo a la célula postgerminal o célula B activada, siendo el perfil de expresión de estos linfomas distinto al del LF clásico positivo para esta traslocación.⁵³ Además, la t(14;18) es característica pero no exclusiva del LF, ya que está presente en otros linfomas B derivados del CG como el linfoma difuso de célula B grande (LDCBG), presente en alrededor del 30% de los pacientes, o la leucemia linfática crónica (LLC), como alteración subclonal evolutiva presente en el 1-3% de los casos.⁵⁶⁻⁵⁹

Por otro lado, la t(14;18) por sí sola no es suficiente para desarrollar el linfoma, son necesarios eventos adicionales que den lugar a la transformación neoplásica de la célula B. Esta evidencia es apoyada en primer lugar por la presencia de células tipo LF (FLLC, *FL-like cells*),² es decir, células B positivas para esta traslocación, en la sangre periférica de aproximadamente el 50% de la población sana, con una frecuencia baja de entre 0.1 y 10 células por millón.^{55;60;61} Esto puede ocurrir también dentro de los órganos linfoides secundarios, donde se observa una expresión elevada de BCL2, hecho que recibe el nombre de neoplasia folicular *in situ* (ISFN).⁵⁵ En segundo lugar, dicha evidencia es apoyada por estudios en modelos murinos en los cuales la expresión constitutiva de BCL2 como consecuencia de la traslocación no da lugar al linfoma, sino que son necesarias otras alteraciones adicionales para desarrollarlo.⁶² A pesar de ello, la presencia de la t(14;18) con una frecuencia de más de una célula por cada 10 000 en sangre periférica, aumenta 23 veces el riesgo de desarrollar LF. Además, en aquellos casos en los que llega a desarrollarse, el *breakpoint* presente en las FLLCs es idéntico al de la población tumoral en el momento del diagnóstico del LF.^{63;64}

Todo esto demuestra que el LF surge como manifestación de una acumulación de alteraciones y procesos oncogénicos durante un largo periodo de tiempo que comienzan con la t(14;18) como evento inicial, seguido de alteraciones adicionales que tienen lugar, principalmente, en los genes codificantes de reguladores de la cromatina *CREBBP* y *KMT2D*, como se describirá en futuros apartados (Figura 6B).^{65;66}

2.2. Definición, subtipos y localización del LF

El linfoma folicular (LF) es un síndrome linfoproliferativo B que comprende una entidad clínico-patológica heterogénea caracterizada por su naturaleza indolente, que explica su larga supervivencia así como las tasas elevadas de respuesta al tratamiento en primera línea. Por otro lado, a día de hoy, el LF se sigue considerando una enfermedad incurable, en la cual un grupo importante de hasta el 45-50% de pacientes recaen y se vuelven refractarios a las terapias convencionales.^{23;55;67;68}

La Organización Mundial de la Salud (OMS) clasifica las neoplasias en función de su origen celular y el estadio madurativo de la célula tumoral que la origina, enmarcando al LF dentro de las neoplasias linfoides de célula B madura (Tabla 1).⁵⁴ Además de la variante clásica, la última clasificación de la OMS define cuatro

variantes de LF: 1) neoplasia folicular in situ (ISFN), descrita en apartados previos; 2) LF duodenal; 3) LF testicular; y 4) variante difusa del LF. Tanto los linfomas cutáneos primarios centro folicular como el LF pediátrico son consideradas entidades diferentes y separadas del LF.⁵⁴

El LF se localiza principalmente en los ganglios linfáticos, pero en ocasiones infiltra MO, bazo y sangre periférica. La localización extraganglionar, aunque puede existir, es poco común, siendo los lugares más frecuentes el tracto gastrointestinal, tejidos blandos, mama y anexos oculares entre otros. En estos casos, la morfología, el fenotipo y la genética son similares al LF ganglionar o nodal, aunque tiende a ser de mayor grado histológico (grado 3) y puede carecer de la proteína BCL2 y de la t(14;18).^{54;69-72}

Tabla 1. Clasificación de las neoplasias de célula B madura según la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2017).

NEOPLASIAS LINFOIDES

NEOPLASIAS DE CÉLULA B MADURA

- Leucemia linfática crónica/Linfoma linfocítico de célula pequeña
 - Linfocitosis B monoclonal tipo LLC
 - Linfocitosis B monoclonal atípica, no LLC
- Leucemia prolinfocítica de célula B
- Linfoma esplénico de zona marginal
- Leucemia de células peludas o Tricoleucemia
- Leucemia/Linfoma esplénico de célula B, no clasificable
 - Linfoma B esplénico de célula pequeña de la pulpa roja
 - Variante de leucemia de células peludas o Tricoleucemia
- Linfoma linfoplasmocítico
 - Macroglobulinemia de Waldenström
- Gammapatía monoclonal de significado incierto de tipo IgM
- Enfermedad de cadena pesada
 - Enfermedad de las cadena pesada μ
 - Enfermedad de la cadena pesada γ
 - Enfermedad de la cadena pesada α
- Neoplasia de célula plasmática
 - Gammapatía monoclonal de significado incierto de tipo no IgM
 - Mieloma de célula plasmática
 - Plasmocitoma solitario de hueso
 - Plasmocitoma extraóseo
 - Enfermedades con depósito de inmunoglobulina monoclonal
 - Amiloidosis primaria
 - Enfermedades con depósito de cadena pesada y cadena ligera
- Linfoma de zona marginal extranodal de tejido linfoide asociado a mucosas (MALT)
- Linfoma de zona marginal nodal
 - Linfoma de la zona marginal nodal pediátrico
- Linfoma folicular**
 - Neoplasia folicular *in situ***
 - Linfoma folicular duodenal**
 - Linfoma folicular testicular**
 - Variante difusa del linfoma folicular**
- Linfoma folicular pediátrico
- Linfoma de célula B grande con reordenamiento de IRF4

Tabla 1. (Continuación)

Linfoma de centro folicular primario cutáneo
Linfoma de células del manto
Neoplasia de células del manto <i>in situ</i>
Linfoma difuso de célula B grande, NOS (<i>not otherwise specified</i>)
Subtipo célula B centro germinal (CGB)
Subtipo célula B activada (ABC, <i>activated B-cell like</i>)
Linfoma difuso de célula B grande rico en células T/histiocitos
Linfoma difuso de célula B grande primario del sistema nervioso central
Linfoma difuso de célula B grande primario cutáneo de la pierna
Linfoma difuso de célula B grande virus Epstein-Barr (VEB) positivo, NOS
Úlcera mucocutánea VEB positivo
Linfoma difuso de célula B grande asociado a inflamación crónica
Linfoma difuso de célula B grande asociado a fibrina
Granulomatosis linfomatoide
Granulomatosis linfomatoide grados 1 y 2
Granulomatosis linfomatoide grado 3
Linfoma de célula B grande primario mediastínico (tímico)
Linfoma de célula B grande intravascular
Linfoma de célula B grande ALK positivo
Linfoma plasmablástico
Linfoma primario de cavidades
Síndromes linfoproliferativos asociados a HHV8
Linfoma de Burkitt
Linfoma de Burkitt con alteración 11q
Linfoma de célula B de alto grado
Linfoma de célula B de alto grado con reordenamientos de MYC y BCL2 y/o BCL6
Linfoma de célula B de alto grado, NOS
Linfoma de célula B no clasificable con características intermedias entre linfoma difuso de célula B grande y linfoma de Hodgkin clásico
Linfoma de Hodgkin

2.3. Epidemiología y etiología

El LF es el linfoma no Hodgkin (LNH) indolente más frecuente, siendo el segundo en frecuencia de todos los LNH de célula B madura tras el LDCBG (20-30%, Figura 7). La epidemiología del LF es variable en cuanto a región geográfica y etnia, no existiendo una cifra de incidencia anual exacta a día de hoy, pero si una estimada de 5 casos nuevos por cada 100 000 habitantes/año, diagnosticando 3 LF de cada 10 linfomas.^{55;73} Las tasas de incidencia más elevadas se encuentran en Europa Occidental y Estados Unidos, siendo de 2 a 3 veces mayor en la raza blanca respecto a la raza negra.^{54;74;75} Por otro lado, la incidencia se ve sesgada hacia las mujeres, con un ratio mujer:hombre de 1.7:1, y se trata de una enfermedad de la edad adulta con una edad media aproximada de 60 años, prácticamente ausente en la población menor de 18 años.^{55;75}

La etiología del LF se desconoce actualmente. Hasta la fecha se ha propuesto una etiología multifactorial con posibles factores de riesgo que incrementan el número de células B portadoras de la t(14;18), como la

exposición a pesticidas y herbicidas, algunos polimorfismos en la región 6p21.32-33 correspondiente al sistema HLA (*human leukocyte antigen*) y otros en loci no HLA.⁷⁶⁻⁷⁹ Ninguno de estos factores se ha confirmado y establecido como factor de susceptibilidad a desarrollar LF, aunque se vea fuerte relación en algunos casos. Por otro lado, tener antecedentes familiares de linfoma también parece aumentar el riesgo de sufrir LF, pero no existe una predisposición familiar confirmada para este tipo de neoplasia.⁸⁰

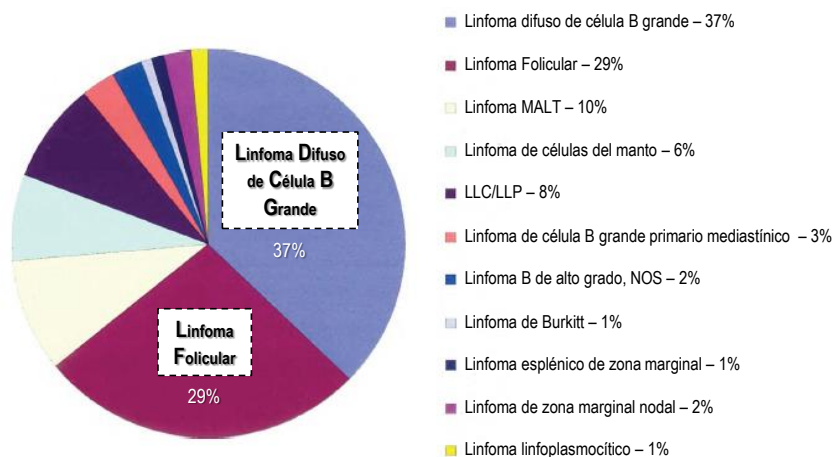


Figura 7. Frecuencias relativas de los linfomas de célula B en adultos. Figura adaptada de *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues* (Swerdlow SH et al. 2017, capítulo 11: p.189-198). En la figura observamos que, a pesar de que hay diferencias entre regiones geográficas y etnia, el linfoma difuso de célula B grande (LDCBG) y el linfoma folicular (LF) son los subtipos más frecuentes a nivel mundial.

2.4. Criterios diagnósticos y clasificación

Es fundamental llevar a cabo un diagnóstico preciso e integrado del LF basado en una biopsia del ganglio linfático o, en los casos en los que el ganglio afectado no sea accesible, una biopsia *core* o biopsia por punción con aguja gruesa. En estos casos se debe tener en cuenta la posible heterogeneidad en el grado de LF teniendo que re-biopsiar si el material no es válido.⁷⁵ La biopsia o aspirado con aguja fina no es adecuado para el diagnóstico de linfomas. El diagnóstico de precisión requiere el estudio morfológico, inmunohistoquímico y citogenético-molecular de la muestra tumoral, como se describirá en futuros apartados.

La biopsia ganglionar se debe acompañar de una exploración física completa, que incluya palpación de todas las áreas ganglionares para la detección de adenopatías, así como del hígado y bazo, y una analítica que incluya los valores de lactato deshidrogenasa (LDH), β 2-microglobulina (β 2-m) y serología para hepatitis B, C y virus de inmunodeficiencia humana o VIH. Es importante llevar a cabo una historia clínica detallada donde se evalúe el estado general del paciente mediante la escala ECOG (*Eastern Cooperative Oncology Group*), que puntúa en función del estado funcional del paciente. Además, es necesaria la realización de una biopsia de MO como estudio de extensión para valorar la posible infiltración medular del LF.

En aquellos pacientes con LF que van a ser candidatos a tratamiento o que presentan enfermedad localizada, es recomendable hacer pruebas de imagen, ya sea tomografía computerizada sola (TC) o combinada con tomografía por emisión de positrones (PET/TC).

2.4.1. Histología y clasificación

A nivel histológico, el LF presenta un patrón de crecimiento folicular que altera la arquitectura normal del ganglio linfático, formando CGs atípicos como consecuencia de la proliferación clonal de dos tipos celulares: centrocitos, células de pequeño a medio tamaño que poseen un núcleo con hendidura nuclear, contorno irregular y un nucleolo poco aparente; y centroblastos, células grandes con un núcleo grande, redondeado y vesicular, con de 1 a 3 nucleolos prominentes rodeados de membrana nuclear (Figura 8). Ambos tipos celulares se encuentran distribuidos de manera aleatoria perdiendo la estructura polarizada normal del CG reactivo.²

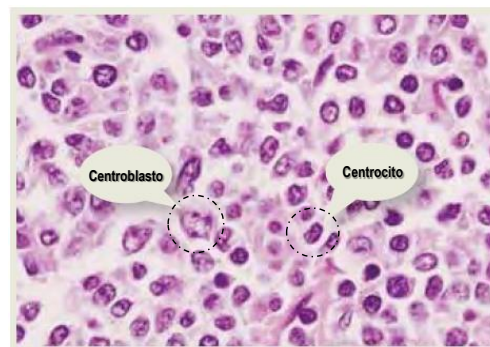


Figura 8. Tipos celulares que componen el LF. Figura adaptada de *ESMO: Lymphomas. Essentials for clinicians* (Moccia AA. & Ghielmini M. 2016, capítulo 7: p.37-42). El LF se compone de una proporción variable de células de pequeño-medio tamaño con núcleo hendido (centrocitos), y células grandes con un núcleo grande, redondeado y vesicular (centroblastos).

En la mayoría de los casos, los centrocitos son las células predominantes en este tipo de linfomas, estando los centroblastos presentes pero en minoría. De esta manera, la proporción de centroblastos variará entre unos casos y otros siendo esta la base de la clasificación histológica del LF.⁵⁴ Por tanto, en función del número de centroblastos por campo de alta resolución (CAR, 40x) evaluados en 10 folículos neoplásicos, podemos clasificar el LF en tres grados histológicos: grados 1 (0-5 centroblastos) y 2 (6-15 centroblastos), correspondientes a LF de bajo grado (80-90% de los casos),⁵⁴ y grado 3 (> 15 centroblastos), donde hablamos de LF de alto grado. El grado 3 a su vez puede ser dividido en A o B en función de la presencia o ausencia de centrocitos, respectivamente. En el caso del grado 3A todavía hay centrocitos presentes, mientras que en el grado 3B únicamente se observan centroblastos “en sábana” (Tabla 2).

Tabla 2. Clasificación histológica del LF en base al número absoluto de centroblastos por campo de alta resolución (CAR).

GRADO	Definición
Grados 1-2 (bajo grado)	0-15 centroblastos por CAR
1	0-5 centroblastos por CAR
2	6-15 centroblastos por CAR
Grado 3 (alto grado)	> 15 centroblastos por CAR
3A	Centrocitos presentes
3B	Centroblastos “en sábana”

Hay evidencias que sugieren que el LF grado 3B debe considerarse como una entidad biológicamente diferente, ya que con frecuencia carece de la t(14;18) y expresión de CD10 en superficie. Además, en estos casos se observa una expresión elevada de MUM1/IRF4, marcadores clásicos de célula B post-germinal, así como una expresión elevada de la proteína p53.^{2;67} Es decir, tanto clínica como biológicamente, el LF grado 3B es más semejante al LDCBG *de novo* que al LF, como se puede ver en la Figura 9, siendo tratados de igual manera, con escasas o ninguna recaída en periodos de más de 5 años.⁸¹⁻⁸⁴

Por otro lado, el índice de proliferación Ki-67 complementa la clasificación histológica del LF, dado que aquellos pacientes que presentan LF de bajo grado, grados 1 y 2, muestran un Ki-67 por debajo del 20%, mientras que los pacientes con LF de alto grado superaran el 20% en todos los casos.⁵⁴

Característica	LF (1-3A)	LF (3B)	LDCBG*
IHQ	CD10+; BCL6+; MUM1/IRF4-	CD10±; BCL6+; MUM1/IRF4+	CD10±; BCL6±; MUM1/IRF4±
Morfología	Patrón folicular	Componente difuso frecuente	Arquitectura difusa con células grandes
Edad	Principalmente en adultos	También presente en niños	También presente en niños
Genética	Principalmente t(14;18)+ Generalmente traslocación BCL6-	Frecuentemente t(14;18)- Frecuentemente traslocación BCL6+	Normalmente t(14;18)- Normalmente traslocación 3q37/BCL6+
Pronóstico	Breakpoint ABR en BCL6	Breakpoint ABR en BCL6	Breakpoint MBR en BCL6
	Traslocaciones en IGH S γ frecuentes	¿Traslocaciones?	Traslocaciones en IGH S μ frecuentes
	Ganancia del chr 7 frecuente	Algunas veces no ganancia del chr 7	En raras ocasiones ganancia del chr 7
	Pronóstico favorable (excepto 3A)	Generalmente mal pronóstico	Generalmente mal pronóstico

*Los casos con predominancia de células transformadas de gran tamaño se incluyen también en esta categoría.

Figura 9. Características diagnósticas del linfoma folicular (LF), LF grado 3B y linfoma difuso de célula B grande (LDCBG). Figura adaptada de *Follicular lymphoma grade 3B* (Salaverria I. & Siebert R. 2011). Esquema simplificado que recoge características frecuentes y diferenciales entre los tres grupos de linfomas. IHQ, inmunohistoquímica; chr, cromosoma.

2.4.2. Inmunofenotipo e inmunohistoquímica

Para llevar a cabo un diagnóstico preciso es necesario analizar los marcadores de superficie en las células tumorales mediante un panel adecuado de inmunohistoquímica (IHQ) que puede completarse mediante un estudio de citometría de flujo (CMF) de las células tumorales en suspensión.

La célula tumoral del LF es similar en cuanto a inmunofenotipo a las células B CG normales. La célula B neoplásica es por tanto positiva para las Igs de superficie (generalmente IgM) y expresa marcadores de superficie típicos de la célula B como CD19, CD20, CD22 y CD79a. Además expresan marcadores del CG como BCL6 y CD10, mientras que son negativas para los marcadores CD5 y CD43. A diferencia de la célula B CG normal, las células neoplásicas son positivas para BCL2, siendo un marcador útil que distingue el folículo neoplásico del folículo normal. Por tanto, la sobreexpresión de BCL2 es la característica distintiva del LF, pero no permite un diagnóstico diferencial de otros linfomas ni su ausencia excluye el diagnóstico de LF. Además de estas células neoplásicas foliculares, existe un conjunto de células acompañantes, principalmente células dendríticas foliculares, positivas para los marcadores CD21 y CD23.

2.4.3. Pruebas moleculares y citogenéticas/FISH

Con el fin de completar o confirmar el diagnóstico, se emplean técnicas moleculares y citogenéticas para detectar de la t(14;18) clásica del LF. Para ello, la técnica molecular recomendada es la amplificación anidada o *nested PCR* de la región cromosómica que contiene el *breakpoint*, y su estudio por análisis del tamaño de los fragmentos o electroforesis capilar. Por otro lado, debido a los múltiples *breakpoints* de esta traslocación, se emplea de forma paralela la técnica citogenética de hibridación *in situ* o FISH (*fluorescent in situ hybridization*), una técnica más sensible que utiliza sondas fluorescentes para el marcaje de los dos cromosomas involucrados en dicho reordenamiento.

En ocasiones en las cuales la biopsia presenta abundante necrosis o mala calidad, o es necesario el diagnóstico diferencial entre un linfoma y un proceso reactivo, el estudio de clonalidad es realmente útil.²³ Para ello se emplea la detección del reordenamiento monoclonal de los genes de las Igs mediante *PCR* y su posterior análisis por electroforesis capilar, observando un único pico correspondiente al reordenamiento clonal de la población de células B tumorales.

En la actualidad se dispone de técnicas moleculares de alta sensibilidad, como la secuenciación de nueva generación (NGS por sus siglas en inglés), que permiten la caracterización molecular en profundidad del LF haciendo posible la detección de alteraciones genéticas relevantes en la patogenia de esta enfermedad, como se detallará en futuros apartados. Sin embargo, su estudio aún está en fase de evaluación, no siendo habitual su detección en la práctica clínica diaria.

2.5. Características clínicas y estadiaje

Al tratarse de un linfoma indolente, generalmente el tumor presenta un crecimiento lento y en el momento del diagnóstico la mayoría de los pacientes presentan una enfermedad generalizada y avanzada, es decir, con presencia de adenopatías periféricas o central (abdominal o torácica) y aumento patológico del bazo o esplenomegalia. Además, en más del 50% de los casos hay afectación de MO, siendo necesaria una biopsia de la misma para evaluarlo.^{23;54} A pesar de estar en etapas avanzadas en el momento del diagnóstico, los pacientes suelen ser asintomáticos y, en raras ocasiones, presentan citopenia. Los síntomas B como fiebre, pérdida de peso y sudoración nocturna, son por tanto poco frecuentes al diagnóstico.

Para evaluar la etapa de la enfermedad en la que se encuentran los pacientes en el momento del diagnóstico se utiliza la clasificación de Lugano publicada por Cheson *et al.* en 2014,⁸⁵ una modificación de la escala de estadiaje o estadificación Ann-Arbor⁸⁶ que tuvo lugar tras la reunión de Lugano en junio de 2011. Ambas clasificaciones se detallan en las tablas 3 y 4, donde se observa que la distinción entre A y B (ausencia o presencia de síntomas B, respectivamente) no es imprescindible en el caso de los LNH, aunque sí lo es para el linfoma de Hodgkin.⁵⁴

Tabla 3. Clasificación Ann Arbor.

Ann Arbor	
Estadio	Afectación
I	Afectación de una única región ganglionar (I) o de un único sitio u órgano extraganglionar (I-E).
II	Afectación de dos o más regiones ganglionares en el mismo lado del diafragma (II) o localizada de un sitio extraganglionar u órgano (II-E) y una o más regiones ganglionares en el mismo lado del diafragma.
III	Afectación de regiones linfáticas ganglionares a ambos lados del diafragma (III), que puedan estar acompañadas por afectación localizada de un sitio u órgano extraganglionar (III-E), esplénica (IIIS), o de ambas (III-ES).
IV	Afectación difusa o diseminada de uno o más órganos extraganglionares distantes, con o sin afectación asociada de los ganglios linfáticos.

- A: sin síntomas B.
- B: fiebre, sudoración nocturna, pérdida de peso superior al 10% del peso corporal en los 6 meses previos.
- X: Bulky > 10 cm.

Tabla 4. Modificación de Lugano de la clasificación Ann Arbor (2014).

Modificación de Lugano (2014)			
	Estadio	Afectación	Afectación extranodal
Limitado	I	Un ganglio o grupo ganglionar	Afectación extraganglionar única sin afectación ganglionar
	II	Dos o más grupos ganglionares a un lado del diafragma	Estadio I ó II por afectación ganglionar con afectación extraganglionar contigua
Avanzado	II Bulky*	Igual al II con enfermedad bulky	N.A.
	III	Ganglios a ambos lados del diafragma o ganglios supradiafragmáticos y afectación esplénica	N.A.
	IV	Afectación extraganglionar no contigua	N.A.

*Masa bulky sólo mantiene su definición en el linfoma de Hodgkin (≥ 10 cm ó $\geq 1/3$ del diámetro torácico).

Nota: Las amígdalas, el anillo de Waldeyer y el bazo se consideran tejido ganglionar.

Los sufijos A y B sólo se requieren en el linfoma de Hodgkin.

2.6. Tratamiento

La variedad en la presentación de la enfermedad de los pacientes con LF al diagnóstico, así como la ausencia de síntomas aparentes, lleva a grandes diferencias en el manejo de los mismos. Un aspecto importante a tener en cuenta es el grado histológico de LF, ya que los pacientes con LF grado 3B deberán ser considerados a efectos terapéuticos como LDCBG.⁸² Por otro lado, la estrategia terapéutica será diferente en función del estadio de la enfermedad que presente el paciente, siendo las establecidas en la práctica clínica y, por tanto más comúnmente utilizadas, la abstención terapéutica (“esperar y ver”) y el anticuerpo monoclonal anti-CD20 rituximab (R) en monoterapia o combinado con quimioterapia (R-IQT). En casos con enfermedad localizada, también se considera la radioterapia (RT) como opción curativa.⁸⁷ En la figura 10 se muestra un algoritmo terapéutico simplificado para los pacientes con LF grado 1-3A según datos bibliográficos.

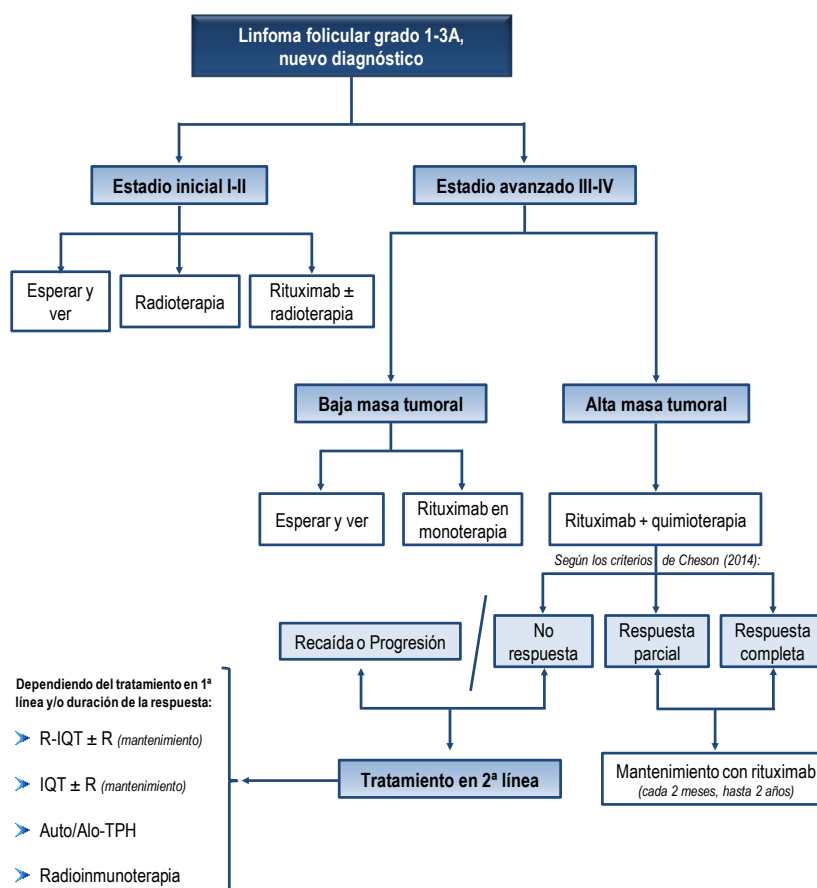


Figura 10. Algoritmo terapéutico simplificado para el LF grado 1-3A. IQT, inmunquimioterapia; R, rituximab; TPH, trasplante de progenitores hematopoyéticos.

2.6.1. Estadio inicial, enfermedad localizada

Sólo el 10-15% de los casos de LF se encuentran en estadios I y II en el momento del diagnóstico, siendo más frecuentes los estadios avanzados de la enfermedad.^{87;88;89}

La radioterapia (RT) sobre el campo afectado a dosis de 24-36 Gys suele ser la opción recomendada, teniendo en cuenta la localización del linfoma y comorbilidades del paciente para evitar la toxicidad derivada. La RT consigue potencialmente la curación del linfoma en el 40-50% de los casos.⁹⁰ Antes de decidir el tratamiento con RT, es fundamental haber realizado un adecuado estadiaje mediante, al menos, PET/TC y biopsia ósea.

En aquellos casos en los que la RT no es aplicable o pueda resultar muy tóxica, la actitud de esperar y ver (*watchful waiting*) podría ser una alternativa, manteniendo a estos pacientes en abstención terapéutica hasta progresión sintomática. Varios estudios demuestran que esta opción no compromete la supervivencia a largo plazo en estos pacientes.^{91;92}

Otra posibilidad es emplear un tratamiento combinado del anti-CD20 rituximab (R) o inmunoterapia (IQT) con RT, con los que se consigue una mejor supervivencia libre de progresión (SLP) pero sin aparente beneficio en la supervivencia global (SG) respecto a la RT sólo.^{93;94} Este anticuerpo actúa reconociendo el antígeno CD20 presente en las células B maduras e inmaduras, y puede desencadenar la muerte de la célula B mediante cuatro mecanismos distintos: i) citotoxicidad mediada por anticuerpos (ADCC), ii) fagocitosis celular mediada por anticuerpos, iii) citotoxicidad dependiente de complemento (CDC), o iv) por inducción directa de apoptosis u otras vías de muerte celular (Figura 11).⁹⁵

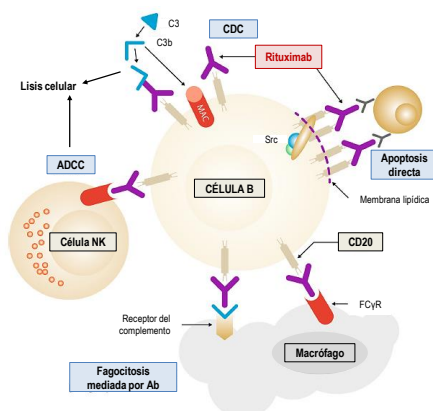


Figura 11. Mecanismo de acción del Rituximab. Figura adaptada de *Rituximab in B-Cell Hematologic Malignancies: A Review of 20 Years of Clinical Experience* (Salles G et al. 2017). Las moléculas de rituximab se unen al marcador de superficie CD20 de las células B y desencadenan la muerte celular, al menos por cuatro mecanismos distintos: (1) activación del complemento que induce lisis de la célula B de manera directa (CDC, complement-dependent cytotoxicity), (2) interacción con células NK (natural killer) vía receptores Fc III (FcRs) permitiendo la citotoxicidad mediada por anticuerpo (ADCC, antibody-dependent cellular cytotoxicity), (3) fagocitosis mediada por anticuerpo (Ab), y (4) interacción con elementos de señalización de membrana que inducen vías de apoptosis directa a través de kinasas Src. MAC, membrane attack complex.

2.6.2. Estadio avanzado, enfermedad generalizada

Los pacientes con LF grados 1 a 3A en estadio avanzado son considerados incurables, observándose varias presentaciones clínicas en el momento del diagnóstico. Los criterios del Groupe d'Etude des Lymphomes Folliculaires o GELF, que clasifican a los pacientes en baja o alta masa tumoral, son los más empleados para definir la actitud terapéutica que se debe adoptar, indicando qué pacientes deben recibir o no tratamiento de manera inmediata (Tabla 5).^{96;97} Se pueden distinguir hasta 4 grupos en función de la sintomatología y la masa tumoral: i) asintomáticos, con baja masa tumoral, ii) asintomáticos, con alta masa tumoral, iii) sintomáticos, con baja masa tumoral, y iv) sintomáticos, con alta masa tumoral. Los grupos i y iv son los escenarios más frecuentes a la hora de decidir el tratamiento del LF.⁶⁷

En base a los criterios GELF, se consideran pacientes con “baja masa tumoral”, y candidatos a “esperar y ver”, a aquellos que no cumplen ninguno de los criterios GELF. Estos pacientes, por lo general, se mantendrán en abstención terapéutica hasta progresión o sintomatología, considerando la opción de administrar R en monoterapia en determinados casos, lo cual se asocia con una prolongación del tiempo hasta necesitar quimioterapia, pero sin demostrar beneficio en la SG.⁷⁵ Por el contrario, aquellos pacientes que cumplen al menos uno de los criterios GELF se consideran de alta masa tumoral y debe plantearse el inicio de tratamiento, siendo su elección dependiente de la presencia de síntomas, comorbilidades y del estado funcional general del paciente.⁷⁵

Tabla 5. Criterios del Groupe d'Etude des Lymphomes Folliculaires o GELF de “baja masa tumoral” de relevancia clínica para seleccionar el tratamiento en primera línea de pacientes con LF.

CRITERIOS GELF “BAJA MASA TUMORAL”	
Ausencia de:	
	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Ganglio o masa tumoral extraganglionar de diámetro ≥ 7 cm ▪ Afectación de, al menos, 3 regiones ganglionares, cada una con un diámetro ≥ 3 cm ▪ Presencia de cualquier síntoma B ▪ Esplenomegalia ▪ Síndrome compresivo ▪ Derrame pleural o ascitis ▪ Afectación de sangre periférica (leucemización) ($> 5 \times 10^9/l$ células tumorales) ▪ Citopenias periféricas (RAN $< 1 \times 10^9/l$ y/o plaquetas $< 100 \times 10^9/l$)

RAN, recuento absoluto de neutrófilos.

La introducción de rituximab en asociación con quimioterapia convencional como tratamiento en primera línea ha supuesto una mejora en el pronóstico de los pacientes con LF. Tras un estudio aleatorizado que compara las combinaciones R-CHOP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisona), R-CVP (ciclofosfamida, vincristina y prednisona) y R-FM (fludarabinamitoxantrona), el régimen R-CHOP mostró más

eficacia frente a R-CVP y menos toxicidad que R-FM, por lo que es una de las opciones recomendadas en la actualidad.^{98,99} Una alternativa a R-CHOP es la combinación R-Bendamustina (RB), que en dos estudios randomizados frente a R-CHOP ha mostrado beneficio en la SLP, aunque sin diferencias en la SG.¹⁰⁰ En pacientes ancianos que presentan comorbilidades se puede utilizar R-CVP o R en monoterapia.⁷⁵

Recientemente se han publicado los resultados de un estudio fase III (*Relevance ClinicalTrials*) que compara el tratamiento estándar de poliquimioterapia (R-CHOP, RB o R-CVP) con un régimen sin quimioterapia que consistía en la combinación de Lenalidomida con R, denominado esquema R².¹⁰¹ Este estudio no mostró diferencias en respuesta, SLP ni SG tras un seguimiento de 120 semanas, aunque el patrón de toxicidad si fue diferente entre ambas ramas mostrando más neutropenia en la rama de quimioterapia, y más reacciones cutáneas, *tumor flare* (ganglios linfáticos dolorosos y/o agrandamiento del bazo, fiebre, erupción cutánea y linfocitosis clara) y diarrea en el brazo R². Estos resultados sugieren la necesidad de un seguimiento mayor para la selección del tratamiento de elección en los pacientes con LF.

2.6.3. Tratamiento de mantenimiento

Debido a que el LF se considera incurable, desde hace décadas se pretende establecer estrategias que mantengan una respuesta prolongada, denominadas tratamiento de mantenimiento. El ensayo clínico PRIMA evaluó la eficacia de R como tratamiento de mantenimiento en pacientes que alcanzaban respuesta completa (RC) o parcial (RP) tras el tratamiento de inducción, observando que su administración a dosis de 375 mg/m² cada dos meses durante dos años prolongaba significativamente la SLP y supervivencia libre de enfermedad (SLE) respecto a la abstención tras el tratamiento, si bien no se observó beneficio en la SG. Los beneficios del R como tratamiento de mantenimiento se observaron independientemente del esquema de inducción administrado y de tipo de respuesta alcanzada, RC o RP, tras primera línea.¹⁰² Por tanto, el tratamiento de mantenimiento con R es una opción recomendada en la mayoría de guías terapéuticas en pacientes que hayan alcanzado RC o RP tras la inducción según los criterios de respuesta de Cheson de 2014 (Tabla 6), evaluando la respuesta por TC o PET/TC.⁸⁵

Un reciente estudio fase 3 ha evaluado la sustitución de R por Obinutizumab en el tratamiento de inducción y mantenimiento en más de mil pacientes con LF (estudio *GALLIUM*), asociándose con mejor SLP, pero a expensas de mayor toxicidad, por lo que el R se sigue considerando estándar por el momento.

Tabla 6. Criterios de respuesta de Cheson. Criterios revisados para la evaluación de la respuesta al tratamiento (2014).

Respuesta y localización	Basada en PET/TC	Basada en TC
Completa	Respuesta metabólica completa (RMC)	Respuesta radiológica completa (todo lo siguiente)
Ganglios	*Score 1, 2 ó 3 con o sin masa residual	Disminución a ≤ 1.5 cm de diámetro mayor
Localizaciones extraganglionares	Se considerará resonancia magnética nuclear en las localizaciones con captación fisiológica alta (anillo de Waldeyer, MO, bazo) si la captación en los sitios de afectación inicial no es mayor que en el tejido normal adyacente	No localizaciones extraganglionares visibles
Lesiones no medibles	N.A.	Ausentes
Aumento de tamaño de órganos	N.A.	Normalización del tamaño
Lesiones nuevas	No	No
Médula ósea	Sin datos de captación	Normal por morfología; si dudas inmunohistoquímica negativa
Parcial	Respuesta metabólica parcial	Respuesta parcial (todo lo siguiente)
Ganglios y localizaciones extraganglionares	*Score 4 ó 5 con captación disminuida	$\geq 50\%$ de disminución en la suma del producto de los diámetros (SPD) de hasta 6 localizaciones ganglionares o extraganglionares medibles. Cuando una lesión sea muy pequeña para medirse por defecto asignar 5x5 mm. Si no es visible 0x0 mm. Para nódulos > 5 mm usar sus medidas reales Normalización o disminución
Lesiones no medibles	N.A.	Reducción de bazo $> 50\%$ del incremento sobre la longitud normal
Aumento de tamaño de órganos	N.A.	No
Lesiones nuevas	No	N.A.
Médula ósea	Captación residual mayor de la normal pero disminuida respecto a la basal. Si persisten captaciones focales en el seno de respuesta ganglionar considerar RMN, biopsia o nuevo PET posterior.	N.A.
No respuesta o enfermedad estable	No respuesta metabólica	Enfermedad estable
Ganglios y localizaciones extraganglionares	*Score 4 ó 5 sin cambios significativos en la captación con respecto a la basal	$< 50\%$ de disminución en la SPD de hasta 6 localizaciones ganglionares o extraganglionares medibles. No criterios de enfermedad progresiva
Lesiones no medibles	N.A.	No aumento consistente con progresión
Aumento de tamaño de órganos	N.A.	No aumento consistente con progresión
Lesiones nuevas	No	No
Médula ósea	Sin cambios respecto a basal	N.A.
Enfermedad progresiva	Enfermedad metabólica progresiva	Se requiere al menos uno de los siguientes
Ganglios y localizaciones extraganglionares	*Score 4 ó 5 con incremento en la captación con respecto a la basal. Aparición de nuevos focos	Aumento del producto de los diámetros perpendiculares (PDP). Para una lesión individual el diámetro longitudinal debe ser > 1.5 cm. PDP $\geq 50\%$ del nadir. Incremento en el diámetro mayor o menor respecto al nadir de 0.5 cm para lesiones ≤ 2 cm y de 1 cm para > 2 cm Esplenomegalia nueva o recurrente (> 2 cm sobre la basal) o crecimiento $> 50\%$ del incremento sobre la longitud normal
Lesiones no medibles	No	Nuevas lesiones no medibles o claro incremento de las preexistentes
Lesiones nuevas	Nuevas lesiones consistentes con linfoma. Si dudas sobre etiología, biopsia o nuevo PET posterior	Recrecimiento de lesiones previamente resueltas. Nuevo nódulo mayor de 1.5 cm en cualquier eje. Una lesión extranodal nueva > 1 cm en cualquier eje. La detección debe ser clara y atribuible al linfoma.
Médula ósea	Afectación nueva o recurrente	Afectación nueva o recurrente

2.6.4. Tratamiento en segunda línea y sucesivas

Aquellos pacientes con LF no respondedores (NR) o refractarios y en recaída tras la terapia en primera línea, serán candidatos a segunda línea de tratamiento. Es muy importante descartar una transformación histológica a linfoma agresivo, llevando a cabo una nueva biopsia, especialmente en los pacientes que presentan niveles elevados de LDH, crecimiento ganglionar rápido con adenopatías voluminosas (>7 cm), síntomas sistémicos, afectación extraganglionar y alta captación en el PET/TC.

La actitud recomendada para pacientes en recaída asintomática es la abstención terapéutica, con vigilancia clínico-biológica activa hasta la aparición de síntomas. Los pacientes que presenten recaída sintomática pueden ser tratados con distintos esquemas terapéuticos en función de la eficacia de los recibidos en primera línea y de la duración de su respuesta. Los pacientes con recaída antes de los 6 meses desde la última dosis de R serán considerados refractarios a R. Una alternativa recomendada en estos casos es la combinación del anti-CD20 obinutuzumab (O) con bendamustina (OB), seguido de mantenimiento con O, ya que un estudio fase 3 ha demostrado que mejora la SG respecto a la bendamustina en monoterapia (estudio *GADOLIN*).¹⁰³ En aquellos pacientes con respuesta más prolongada, se puede administrar R de nuevo combinado con bendamustina o CVP, si en primera línea se administró R-CHOP, o combinado con CHOP, si en primera línea recibió RB, con la posibilidad de administrar tratamientos de mantenimiento con R si no se administró en primera línea o si la respuesta fue duradera.⁷⁵ Por otro lado, en aquellos pacientes jóvenes en recaída que sean candidatos a consolidación con trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos (auto-TPH), se puede administrar R-ESHAP (etopósido, prednisolona, ARA-C y cis-platino) u otro régimen de rescate empleado en linfomas agresivos como tratamiento de rescate pre-consolidación.

El auto-TPH se recomienda para pacientes que hayan recaído de forma precoz tras primera línea, en los dos primeros años tras el inicio de tratamiento, pudiendo alcanzarse remisiones muy prolongadas en una proporción significativa de pacientes (*ESMO Clinical Practice Guidelines*). La opción del trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (alo-TPH) es una opción razonable para pacientes en recaída tras auto-TPH o en tercera o sucesivas remisiones. Aunque es un procedimiento potencialmente curativo, tiene una elevada tasa de morbi-mortalidad asociada al trasplante, principalmente por enfermedad injerto contra huésped (EICH) o infecciones derivadas de la inmunosupresión.^{104;105}

Otras opciones terapéuticas son la radioinmunoterapia (anticuerpos anti-CD20 conjugados con radioisótopos), recomendada sobre todo en pacientes no candidatos a trasplante, y los inhibidores de PI3K, como idelalisib, recomendados a partir de tercera línea, sobre todo en pacientes quimio-refractarios (*ESMO Clinical Practice Guidelines*).^{75;106}

2.7. Pronóstico del LF

El LF se caracteriza por presentar un patrón de múltiples recaídas, una disminución del tiempo de respuesta al tratamiento y una adquisición gradual de resistencia o refractariedad a diferentes terapias, a pesar de que la SG tras la introducción del rituximab haya aumentado hasta casi los 20 años.^{54;55;102} Aunque hay pacientes que se mantienen libres de progresión durante un tiempo prolongado, alrededor del 20% de los pacientes con LF experimentan recaída o progresión en los primeros dos años desde el tratamiento (POD24, *progression of disease within 24 months*).^{107;108} Además, aproximadamente el 25-30% de los pacientes con LF experimentan una transformación histológica (TH) a linfoma agresivo, principalmente LDCBG, con una tasa del 2-3% por año.^{23;54} La TH se considera uno de los eventos de peor pronóstico en el LF, ya que estos pacientes presentan bajas tasas de curación con las terapias convencionales y una supervivencia muy inferior a la de los pacientes con LF sin TH.^{109;110} A pesar de ello, estudios recientes reportan un grupo reducido de pacientes con TH que exhiben una respuesta prolongada con los nuevos esquemas terapéuticos basados en rituximab.^{111;112}

La heterogeneidad clínica y variabilidad pronóstica de los pacientes con LF hace que uno de los mayores retos en las últimas décadas sea identificar en el momento del diagnóstico tanto a los pacientes con buen pronóstico, candidatos a terapias menos tóxicas e intensivas, como a aquellos de mal pronóstico que presentarán recaídas, resistencias o TH. Para ello se han desarrollado diferentes índices o modelos pronósticos que integran factores pronósticos relacionados con el paciente, como la edad, el estadio, la hemoglobina o la β 2-m, con factores intrínsecamente relacionados con la biología de la enfermedad, como la LDH.

2.7.1. Modelos pronósticos al diagnóstico

El Índice Pronóstico Internacional del Linfoma Folicular o FLIPI es el marcador pronóstico por excelencia para el LF en la práctica clínica diaria. Surge en 2004 a partir de la modificación del Índice Pronóstico Internacional (IPI) y asigna un punto por cada uno de los cinco factores que lo integran, los cuales son predictores de menor SG de manera independiente (Tabla 7). De esta forma, los pacientes se clasifican en tres grupos de riesgo predictores de SG (Figura 12A): riesgo bajo (0 y 1 punto), riesgo intermedio (2 puntos) y riesgo alto (3, 4 o 5 puntos).¹¹³ Debido a que el FLIPI fue desarrollado en la era pre-rituximab, en 2009 se desarrolla el FLIPI2 a partir de datos de pacientes tratados con esquemas terapéuticos que incluían rituximab (Tabla 7). Este índice pronóstico también clasifica a los pacientes en 3 grupos de riesgo, siendo de gran utilidad para predecir SLP, ya que los factores que lo integran lo son de manera independiente.¹¹⁴ Sin embargo, el FLIPI es el modelo de estratificación de riesgo más ampliamente utilizado actualmente ya que ha sido validado en repetidas ocasiones en distintos ensayos clínicos usando quimioterapia asociada a R, además de ser validado en un estudio de 2200 pacientes en el *National LymphoCare Study* (NLCS).¹¹⁵⁻¹¹⁷

Más recientemente, se plantea un modelo pronóstico simplificado denominado índice pronóstico PRIMA (PRIMA-PI) que integra sólo dos factores: afectación de MO y niveles de $\beta 2$ -m. El PRIMA-PI clasifica a los pacientes con LF en tres categorías predictoras de SLP en pacientes tratados con IQT: riesgo bajo ($\beta 2$ -m \leq 3 mg/L sin infiltración de MO), riesgo intermedio ($\beta 2$ -m \leq 3 mg/L con infiltración de MO) y riesgo alto ($\beta 2$ -m $>$ 3 mg/L). Sin embargo, pese a su simplicidad, actualmente no se aplica en la práctica diaria.¹¹⁸

Tabla 7. Factores de riesgo que integran el índice pronóstico internacional para el linfoma folicular, antes (FLIPI) y después (FLIPI2) de la era rituximab.

Índice Pronóstico Internacional del Linfoma Folicular	
FLIPI	FLIPI2
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Edad \geq 60 años ▪ Estadio Ann Arbor III ó IV ▪ Hemoglobina $<$ 12 g/dl ▪ LDH $>$ valor límite máximo de la normalidad ▪ Número de afectaciones ganglionares \geq 5 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Edad $>$ 60 años ▪ Afectación de médula ósea ▪ Hemoglobina $<$ 12 g/dl ▪ $\beta 2$ microglobulina $>$ valor límite máximo de la normalidad ▪ Afectación ganglionar $>$ 6 cm de diámetro máximo
Grupo de riesgo: Bajo: 0-1 factor de riesgo; Intermedio: 2 factores de riesgo; Alto: 3-5 factores de riesgo	

Con el fin de refinar los índices pronósticos descritos y gracias a los avances en las tecnologías de secuenciación de ADN, el grupo alemán *German Low-Grade Lymphoma Study Group* (GLSG) describe en 2015 el m7-FLIPI, un modelo pronóstico de riesgo clínico-genético que integra factores clínico-biológicos (FLIPI y ECOG) con el estado mutacional de 7 genes (*EZH2*, *ARID1A*, *MEF2B*, *EP300*, *FOXO1*, *CREBBP*, y *CARD11*). Este modelo clasifica a los pacientes con LF en dos grupos de riesgo con diferente supervivencia libre de fracaso terapéutico (SLFT) (Figura 12B).¹¹⁹ Un año después, se publica el modelo clínico-genético de riesgo POD24-PI, una modificación del m7-FLIPI para predecir progresión de la enfermedad en los 24 meses tras primera línea de tratamiento (POD24), que incluye cuatro (FLIPI, *EP300*, *FOXO1* y *EZH2*) de los nueve factores del m7-FLIPI.¹²⁰ Sin embargo, esta evolución en la clasificación de riesgo no está todavía implementada en la práctica clínica y ninguno de estos índices pronósticos aporta pautas en el manejo inicial de los pacientes con LF.

2.7.2. Factores pronósticos dinámicos

Además de los factores pronósticos identificados al diagnóstico comentados previamente, existen factores pronósticos que podemos denominar dinámicos y que predicen riesgo de progresión y supervivencia de acuerdo a eventos que tienen lugar a lo largo de la evolución de la enfermedad. La respuesta al tratamiento en primera línea y la respuesta a los 30 meses desde su inicio, evaluadas por TC o PET/TC, son los factores pronósticos dinámicos más relevantes en el LF.

Parece intuitivo pensar que la respuesta al tratamiento determine el riesgo de progresar, así como la supervivencia global del paciente. Por ello, evaluar la respuesta por TC o PET/TC tras completar los ciclos de tratamiento está implementado en la práctica diaria. Los pacientes que tras el tratamiento están en RP o NR presentan mayor riesgo de progresión y peor pronóstico que aquellos en RC que, por el contrario, tienen una mayor SG.^{117,121;122}

Sin embargo, la evaluación de la respuesta a los 30 meses desde el inicio del tratamiento es el factor pronóstico dinámico que parece tener más fuerza en el LF, ya que es un claro indicador de la duración de la respuesta tras el tratamiento en primera línea.¹¹⁷ Por tanto, estar en RC por TC o PET/TC a los 30 meses desde el inicio del tratamiento (CR30) se correlaciona con una SG prolongada similar a la de la población sana de igual sexo y edad (Figura 12C).^{108;123;124}

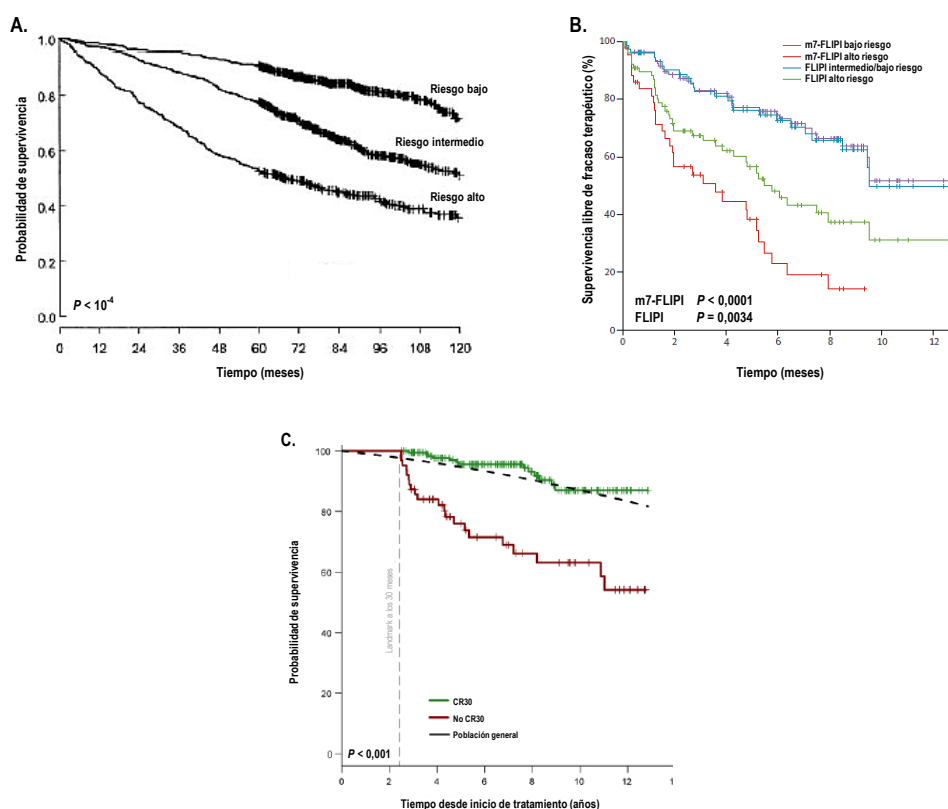


Figura 12. Pronóstico de los pacientes con LF según los índices (A) FLIPI, (B) m7-FLIPI, y el factor dinámico (C) respuesta completa a los 30 meses desde inducción (CR30). (A) Figura adaptada de *Follicular Lymphoma International Prognostic Index* (Solal-Céligny P et al. 2004) en la que se puede observar la supervivencia global de 1795 pacientes con LF de acuerdo a los grupos de riesgo definidos por el FLIPI. (B) Figura adaptada de *Integration of gene mutations in risk prognostication for patients receiving first-line immunochemotherapy for follicular lymphoma: a retrospective analysis of a prospective clinical trial and validation in a population-based registry* (Pastore A et al. 2015) donde se observa la supervivencia libre de fracaso terapéutico de 151 pacientes con LF de acuerdo a los grupos de riesgo definidos tanto por el FLIPI como por el m7-FLIPI. (C) Figura adaptada de *Patients with follicular lymphoma (FL) in maintained complete response (CR) at 30 months show a survival similar to a sex- and age-matched spanish general population* (Magnano L et al. 2017) donde se observa que aquellos pacientes que alcanzan CR30 presentan una supervivencia global similar a la de la población general de igual sexo y edad (n=263).

3. CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA DEL LF

3.1. Genes de las Igs

El LF pertenece al grupo de neoplasias linfoides de célula B madura y, por tanto, está constituido por células B que expresan un reordenamiento clonal de los genes de las Igs en su superficie. Como se ha comentado previamente, este reordenamiento supone la unión de los segmentos génicos IGHV, IGHD e IGHJ dando lugar a una Ig funcional que se someterá tanto a HMS como a CSR. En el caso de la cadena pesada de la Ig, podemos hablar de aproximadamente 57 segmentos génicos IGHV funcionales clasificados en 7 subgrupos o familias, 27 segmentos génicos IGHD, también clasificados en 7 subgrupos, y 6 segmentos génicos IGHJ. Entre estos, los genes IGHV presentan la tasa de HMS más elevada y por tanto, una gran variabilidad que favorece el reconocimiento antigénico.^{54;125;126} Por tanto, estudiar las características moleculares del reordenamiento en IGH y su HMS aporta información sobre la ontogenia de la población celular responsable del tumor.

El repertorio de genes IGHD, IGHJ y, más extensamente, IGHV, así como la HMS, han sido analizados y estudiados tanto en células B normales como en enfermedades autoinmunes y neoplasias linfoides de célula B. En muchas ocasiones, se ha detectado un sesgo en el repertorio o uso de genes IGH, observando asociaciones entre determinados genes IGHV con patógenos o neoplasias linfoides. Algunos ejemplos de este tipo de asociaciones se pueden encontrar en la leucemia linfática crónica (LLC),¹²⁷⁻¹³⁰ LDCBG,¹³¹ linfoma esplénico de zona marginal (LEZM),¹³² macroglobulinemia de Waldenström (MW)¹³³ y linfoma de células del manto (LCM).¹³⁴ Sin embargo, a pesar de que el LF es el LNH indolente más frecuente, son pocos los estudios que han analizado la distribución de genes IGHV en esta neoplasia, siendo la mayoría basados en series de pacientes cortas o seleccionadas, sin evaluar su impacto clínico.^{135;136} Concretamente, se ha observado mayor frecuencia de los subgrupos IGHV3 e IGHV4, así como de los genes IGHV3-23, IGHV3-30, IGHV1-18 e IGHV3-48 con respecto a su uso en las células normales u otras neoplasias de célula B.¹³⁷⁻¹³⁹ Recientemente, Berget *et al.* describen una asociación entre el uso de IGHV5 o usar más de un subgrupo o familia de IGHV con peor SG, en una serie de 106 pacientes con LF.¹⁴⁰ A pesar del sesgo observado en el uso de alguno de estos genes en LF, no hay información de su papel en la respuesta al tratamiento o respuesta a los 30 meses, ni tampoco en SLFT y riesgo de TH.

Por otro lado, como es bien conocido, el LF tiene su origen en una célula B del CG y por ello en casi la totalidad de los casos presentará una tasa elevada de HMS. Esto indica que el patrón de mutaciones puede dar información sobre la patogénesis y la clínica del LF, pero no tanto su clasificación en mutado o no mutado en

función de su identidad con la línea germinal, ya que los casos con ausencia de mutaciones somáticas serán escasos en este tipo de neoplasia, a diferencia de lo que ocurre por ejemplo en la LLC.¹⁴¹

3.2. Alteraciones cromosómicas

La alteración cromosómica por excelencia del LF es la t(14;18), presente en el 90% de los casos. Como se comenta en epígrafes previos, esta traslocación no es suficiente por sí sola para desarrollar el linfoma y por ello en aproximadamente el 90% de los casos se observan alteraciones cromosómicas secundarias o adicionales. La combinación de técnicas citogenéticas convencionales, arrays de hibridación genómica comparativa (aCGH) y microarrays de polimorfismos (SNP array) han permitido identificar alteraciones cromosómicas o alteración del número de copias (CNAs, *copy number alterations*) recurrentes en el LF, como son pérdidas en 1p y 6q, y ganancias en el cromosoma 7, 18q y X. Una de las regiones más comúnmente afectadas, con pronóstico adverso, es la región 1p36, cuya pérdida o delección supone la deficiencia del gen *TNFRSF14* involucrado en modulación inmune.^{142;143} Del mismo modo, las pérdidas en 6q tienen como consecuencia la delección del gen *EPHA7*. Este gen es un supresor de tumores cuya expresión está ausente en aproximadamente el 70% de los casos de LF debido a su delección o, en algunas ocasiones, a su silenciamiento a través de mecanismos epigenéticos.^{68;144}

Las técnicas de secuenciación de nueva generación permiten conocer el perfil mutacional del LF, observando entre 5-50 alteraciones cromosómicas por biopsia tumoral, que incluyen desde deleciones e inserciones grandes, hasta duplicaciones y traslocaciones.⁵⁵ Por tanto, y gracias a ello, se conoce un gran número de alteraciones adicionales y frecuentes en el LF como son las pérdidas en 10q, 13p y 17p, y ganancias en el cromosoma 1, 2p, 6p, 8 y 12q.¹⁴⁵⁻¹⁴⁷ Muchos de estos eventos o alteraciones cromosómicas pueden ser consideradas pasajeras o *passenger* a diferencia de otras como la t(14;18), consideradas eventos iniciales o *driver*. Todos estos hallazgos muestran la gran complejidad genómica del LF y sugieren que la patogénesis de dicha neoplasia es el resultado de múltiples alteraciones biológicas, siendo mayor su número cuanto mayor es el grado histológico del LF.¹⁴⁸ A día de hoy, la utilidad de CNAs como biomarcador pronóstico no es clara, ya que los estudios muestran gran variabilidad y pérdida de reproducibilidad.² A pesar de ello, algunas regiones se han visto asociadas a menor SG como son alteraciones en 1p, 6q y 17p, e incluso a TH en el caso de 1p36.22-p36.33 y 6q21-q24.3.^{142;147-149}

Por otro lado, la pérdida de heterocigosidad (LOH, *loss of heterozygosity*) o la disomía uniparental adquirida (aUPD, *acquired uniparental disomy*), causa principal de la LOH de copia neutral (cnLOH), que surgen de errores o falta de disyunción en la recombinación mitótica, aportan una forma de homocigosis celular para una alteración pre-existente sin alterar la dosis cromosómica.² Esto ocurre con frecuencia en el LF y no puede

ser detectado por las técnicas citogenéticas convencionales, FISH o aCGH. Sin embargo, la implementación de SNP arrays de alta resolución ha permitido la identificación de LOH y aUPD que afectan a las regiones 1p36, 6p, 12q y 16p, y en algunos casos afectando a un sólo gen como es el caso de *CDKN2A* y/o *CDKN2B* (9p21-22).¹⁵⁰ Estos genes actúan como supresores de tumores y codifican las proteínas p14/p16 y p15, respectivamente, que funcionan inhibiendo la activación de las quinasas dependientes de ciclinas (CDKs). La aUPD es más frecuente en el momento del diagnóstico y, en el caso de 1p36 y 16p, se correlaciona con peor SG y con TH.¹⁵¹

Recientemente, Qu X *et al.* describen un gran número de marcadores pronósticos a nivel de CNAs, entre ellos ganancias en 1q, cnLOH en 2p y deleciones de 2q, 4q, 5q, 8p, 8q, 15 y 22. Pero lo más interesante es la asociación significativa entre el incremento de la complejidad genómica a nivel de CNAs y un peor pronóstico clínico. En concreto, demuestran que la presencia de 12 o más alteraciones cromosómicas en los pacientes con LF implica una mayor tasa de progresión temprana en los dos primeros años, mejorando la estratificación de riesgo del LF. Por otro lado, este grupo defiende que aquellos pacientes con cnLOH de 2p presentan mayor riesgo de progresión temprana y, por tanto, menor SLP, de la misma forma que aquellos con deleción de los genes *CDKN2A/B* (9p). En la misma línea, aquellos pacientes con LF y pérdidas de los genes *CREBBP* (16p) y *TP53* (17p) muestran una SG inferior al resto.¹⁵²

3.3. Mutaciones somáticas

Los avances y mejoras en las técnicas de secuenciación de ADN han permitido conocer en profundidad el perfil mutacional del LF observando que, de la misma forma que ocurre con las alteraciones cromosómicas, las mutaciones somáticas contribuyen de manera importante al desarrollo del LF. Estas lesiones causan el bloqueo de las células B en su estadio proliferativo CG de diferenciación y evitan que estas células tipo LF se diferencien a células de memoria o células plasmáticas, es decir, que finalicen la reacción CG.¹⁵³ En la figura 13 y tabla 8 se resumen las mutaciones recurrentes y vías celulares alteradas involucradas en el desarrollo y patogénesis del LF que se detallarán a continuación.

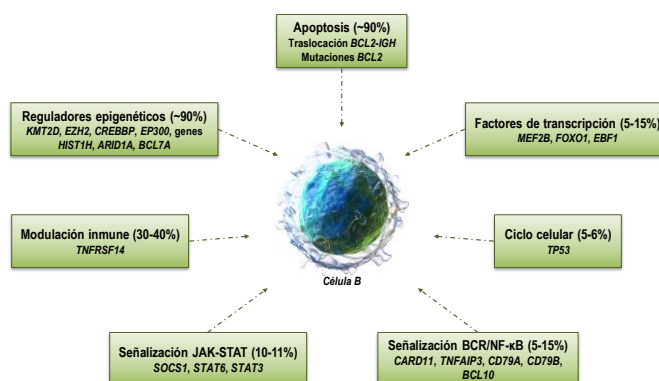


Figura 13. Esquema resumido de las mutaciones recurrentes y vías biológicas afectadas en el LF. En la figura se muestran las siete categorías funcionales más comúnmente afectadas en el LF junto con los genes más frecuentemente mutados o alterados en cada caso.

Tabla 8. Mutaciones somáticas recurrentes en el linfoma folicular (LF).

Categoría funcional	Gen	Función	Frecuencia	Consecuencia	Referencias
Regulación epigenética	<i>KMT2D</i>	Histona H3K4 metiltransferasa	60-90%	Pérdida de función	2; 65; 155-157
	<i>EZH2</i>	Histona H3K27 metiltransferasa	20-30%	Ganancia de función	156; 158-160
	<i>CREBBP</i>	Histona H3K27 y H3K18 acetiltransferasa	60-70%	Pérdida de función	153; 155; 161
	<i>EP300</i>	Histona H3K27 y H3K18 acetiltransferasa	10-20%	Pérdida de función	153; 155; 161
	Familia <i>HIST1H</i>	Histonas conectoras o <i>linker</i>	20-40%	Desconocida	162
	<i>ARID1A</i> <i>BCL7A</i>	Remodelación de los nucleosomas; complejo SNF/SWI	10-15%	Desconocida	154; 162
Modulación inmune	<i>TNFRSF14</i>	Receptor; modula la respuesta inmune innata y adaptativa en células B y T	30-40%	Pérdida de función	163-167
Vía BCR/NF-κB	<i>CARD11</i>	Proteína <i>scaffold</i> ; complejo CBM	10-15%	Ganancia de función	119; 153; 169
	<i>TNFAIP3</i>	Regulador negativo	5-10%	Pérdida de función	2; 154; 156
	<i>CD79A</i> <i>CD79B</i>	Heterodímero transmembrana; receptor BCR	5%	Desconocida	156
	<i>BCL10</i>	Complejo CBM	5%	Pérdida de función	154
Vía JAK-STAT	<i>SOCS1</i>	Regulador negativo sobre kinasa JAK	10%	Pérdida de función	154; 156
	<i>STAT6</i> <i>STAT3</i>	Factores de transcripción citoplasmáticos	11%	Ganancia de función	168
Apoptosis	<i>BCL2</i>	Proteína anti-apoptótica	50%	Desconocida	154; 170
Ciclo celular	<i>TP53</i>	Gen supresor de tumores	5-6%	Pérdida de función	171; 172
Factores de transcripción	<i>MEF2B</i>	Activador transcripcional epigenética; activador de <i>BCL6</i> en	10-15%	Ganancia de función	154; 172-174
	<i>FOXO1</i>	Mantenimiento de la DZ del CG	5-10%	Ganancia de función	153; 175; 176
	<i>EBF1</i>	Desarrollo de la célula B	10%	Pérdida de función	2; 156; 177; 178

3.3.1. Mutaciones en reguladores epigenéticos

Los reguladores epigenéticos comprenden un conjunto enzimático encargado de la regulación de la expresión génica mediante mecanismos epigenéticos que cambian y regulan la conformación de la cromatina (complejo de ADN asociado a histonas). La cromatina puede estar en forma de heterocromatina, condensada y reprimida transcripcionalmente, o en forma de eucromatina, activa transcripcionalmente.² La alteración de estas enzimas responsables de la regulación de la cromatina causa la desregulación epigenética, convirtiéndose en una marca distintiva o *hallmark* del LF presente en casi la totalidad de los pacientes.¹⁵⁴ Los genes principalmente involucrados son los codificantes de las histona metiltransferasas, *KMT2D* (también conocido como *MLL2*) y *EZH2*, y las histona acetiltransferasas, *CREBBP* y *EP300* (Figura 14).

Entre el 60-90% de los pacientes con LF presentan mutaciones, generalmente múltiples, a lo largo del gen *KMT2D*, responsable de la metilación de la lisina 4 en la histona 3 (H3K4) y activación de la transcripción.^{65;155;156} La mayoría de las mutaciones que afectan a este gen son mutaciones de pérdida de función, principalmente de tipo *frameshift* (producen un cambio en el marco de lectura) o *nonsense* (mutaciones sin sentido que truncan la proteína).² Modelos murinos muestran el papel de *KMT2D* como gen supresor de tumores, ya que la pérdida de su función conlleva una expansión clonal de las células B CG promoviendo la linfomagénesis.¹⁵⁷ Sin embargo, en el caso del gen *EZH2* responsable de la metilación de la lisina 27 de la histona 3 (H3K27), las mutaciones son de ganancia de función y están presentes en aproximadamente el 20-30% de los casos.^{156;158} *EZH2* codifica una enzima perteneciente al complejo PRC2 (*polycomb repressor complex 2*) responsable de la represión transcripcional o silenciamiento génico, cuyas mutaciones suelen ser heterocigotas y están agrupadas en el dominio catalítico SET, afectando principalmente a los aminoácidos Y646, A682 y A692. La función incrementada de esta proteína conlleva la trimetilación de H3K27, debido a la acción sinérgica de la proteína *wild-type* y la alterada.^{159;160}

Tanto el gen *CREBBP* como el gen *EP300* codifican histona acetiltransferasas, enzimas activadoras de la transcripción responsables de la acetilación de las lisinas 27 y 18 de la histona 3 (H3K27 y H3K18), alteradas en el LF en el 60-70% y 10-20% de los casos, respectivamente.^{153;155;161} Estos genes presentan mutaciones o pequeñas deleciones en heterocigosis que causan pérdida de función, agrupadas principalmente en el dominio catalítico de la proteína o dominio HAT. Además, ambas enzimas acetilan también proteínas no histónicas tan importantes como las codificadas por *BCL6* y *TP53*, factores de transcripción claves en la fisiología de la célula B. Por tanto, la función deficiente de estas acetiltransferasas causa la inhibición de la apoptosis mediada por *TP53*, normalmente activada por acetilación, así como el aumento de función de la proteína codificada por *BCL6* en las células B CG mutantes, proteína normalmente inactiva como consecuencia de su acetilación.¹⁶¹

Por otro lado, son frecuentes en el LF las mutaciones en genes *HIST1H* (Figura 14), codificantes de histonas de la familia H1 conectoras o *linker*, presentes aproximadamente en el 20-40% de los casos. La mayoría de estas mutaciones afectan a los genes *HIST1H1C* y *HIST1H1E*, pero el resto de miembros de la familia H1 también pueden verse alterados.¹⁶²

Por último, se han descrito alteraciones en genes codificantes de proteínas encargadas de la remodelación de los nucleosomas, estructuras formadas por ADN asociado a un octámero de histonas, que forman parte del complejo SNF/SWI (Figura 14). Los genes *ARID1A* y *BCL7A* son los principalmente afectados, en torno al 10-15% de los casos.^{154;162}

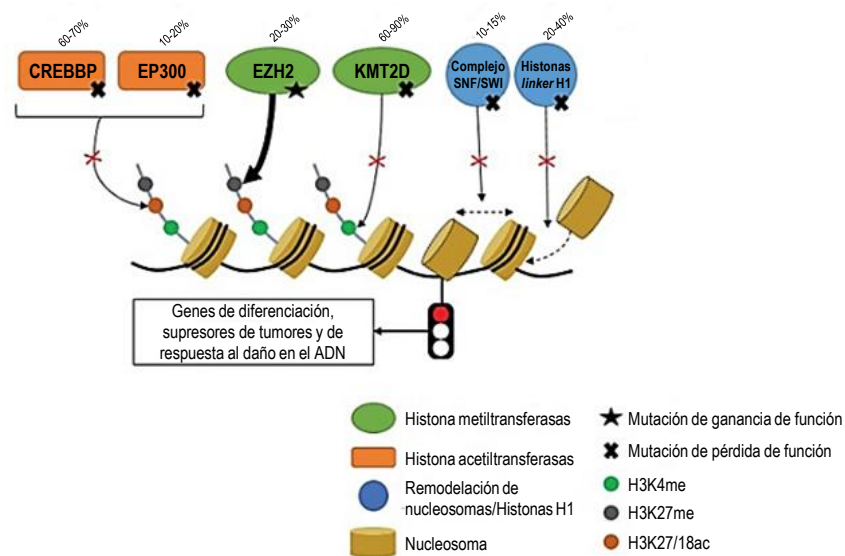


Figura 14. Reguladores epigenéticos mutados con mayor frecuencia en el LF. Figura adaptada de *Follicular lymphoma, a B cell malignancy addicted to epigenetic mutations* (Korfi K. et al. 2017). Modelo esquemático de los principales genes mutados recurrentemente en el LF involucrados en regulación epigenética, una de las características distintivas de este tipo de linfoma B CG. H3K4me, metilación de la lisina 4 de la histona 3; H3K27me, metilación de la lisina 27 de la histona 3; H3K27/18ac, acetilación de las lisinas 27 y/o 18 de la histona 3.

3.3.2. Mutaciones en moduladores de la respuesta inmune

El 30-40% de los pacientes con LF presentan mutaciones en el gen *TNFRSF14* (también llamado *HVEM*), que codifica una molécula de superficie expresada en las células B y T con un papel importante en co-estimulación y co-inhibición de la respuesta inmune innata y adaptativa.^{163;164} Este gen pertenece a la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (familia *TNFR*) y presenta habilidad para interactuar con cinco tipos de ligandos: BTLA (atenuador de linfocitos B y T), LIGHT (también conocido como *TNFSF14*), CD160, linfotxin α y gD.^{165;166} Por tanto, la pérdida de función como consecuencia de mutaciones somáticas o la deficiencia de este gen inducen un microambiente de soporte tumoral que resulta en la activación de un estroma linfoide alterado con mayor reclutamiento de células T *helper* foliculares (T_{FH}), impulsando la proliferación y desarrollo del LF (Figura 15A).¹⁶⁷

3.3.3. Mutaciones que afectan a la vía JAK-STAT

La vía JAK-STAT es responsable de la transmisión de múltiples señales celulares de tipo anti-apoptótico, proliferativas y de diferenciación en la célula normal, estando activada de forma constitutiva en multitud de neoplasias. Mutaciones en proteínas que integran dicha vía son frecuentes en el LF, tanto en proteínas intrínsecas de la vía como responsables de su regulación (Figura 15B). El gen *SOCS1*, un regulador negativo que actúa de manera directa sobre la kinasa JAK, se encuentra mutado en aproximadamente el 10% de los casos de LF, siendo principalmente estas mutaciones de pérdida de función.^{154;156} Por otro lado, el gen *STAT6* y, en menor frecuencia, el gen *STAT3*, que codifican factores de transcripción citoplasmáticos de la familia STAT, pueden mostrarse alterados también en este grupo de pacientes. *STAT6* se encuentra alterado en aproximadamente el 11% de los pacientes, agrupándose las mutaciones principalmente en el aminoácido 419 localizado en el dominio de la proteína de unión al ADN, siendo en su mayoría mutaciones de ganancia de función. La proteína *STAT6* alterada se localiza preferentemente en el núcleo y, en presencia de la IL-4, induce activación de la expresión de genes diana favoreciendo el desarrollo del LF.¹⁶⁸

3.3.4. Mutaciones que afectan a la vía BCR/NF-κB

En general, en todos los linfomas de célula B, incluido el LF, son frecuentes las alteraciones génicas que afectan a reguladores positivos y negativos de la vía de señalización anti-apoptótica NF-κB (Figura 15C).² Entre los genes involucrados en esta vía, el gen *CARD11*, que codifica la proteína *scaffold* del complejo proteico CBM (*CARD11-BCL10-MALT1*) que media la activación de dicha vía, se encuentra mutado en los pacientes con LF en torno al 10-15%.^{119;153;169} Las mutaciones que afectan a este gen son principalmente de ganancia de función y están agrupadas en el dominio proteico denominado *coiled-coil*. Por el contrario, las mutaciones en el gen *TNFAIP3*, alterado en aproximadamente el 5-10% de los pacientes con LF, son principalmente de pérdida de función y suelen estar combinadas con deleciones en el alelo no mutado del gen. *TNFAIP3* codifica la proteína A20 que actúa como regulador negativo de la vía NF-κB.^{2;154;156}

Otros componentes de la vía que suelen estar alterados como consecuencia de mutaciones somáticas son los genes *CD79A*, *CD79B* y *BCL10*, en frecuencias del 5%.¹⁵⁴ *CD79A* y *CD79B* codifican proteínas transmembrana unidas entre sí por puentes disulfuro formando un heterodímero asociado al receptor de la célula B (BCR). Las mutaciones principalmente son de tipo *frameshift*, sobre todo en *CD79B*, y se agrupan en el dominio ITAM (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) de la proteína.¹⁵⁶

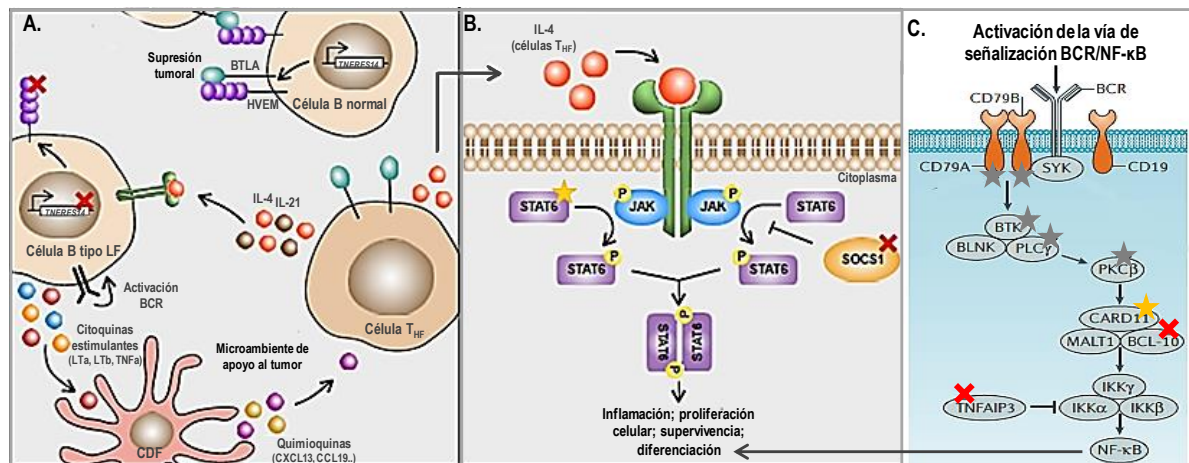


Figura 15. Principales vías celulares alteradas en el LF. Figura adaptada de *Pathogenesis of follicular lymphoma* (Lackraj T. et al. 2018) y *From genetics to the clinic: a translational perspective on follicular lymphoma* (Huet S. et al. 2018). Representación esquemática de (A) la principal vía de modulación inmune alterada en el LF iniciada por el gen *TNFRSF14* que codifica la molécula de superficie mostrada en la imagen como HVEM; (B) la vía celular JAK-STAT; y (C) la vía de señalización BCR/NF-κB. En la figura, las mutaciones de ganancia de función son representadas con una estrella amarilla, las de pérdida de función con una cruz roja y las mutaciones de impacto funcional desconocido con una estrella gris. Los grupos fosfato son representados por una P dentro de un círculo amarillo. BCR, receptor de célula B; BTLA, atenuador de linfocitos B y T; CDF, célula dendrítica folicular; IL-4, interleucina 4; IL-21, interleucina 21; THF, célula T helper folicular.

3.3.5. Mutaciones en genes involucrados en apoptosis y ciclo celular

El gen *BCL2*, además de estar involucrado en la t(14;18), se encuentra mutado en casi la mitad de los casos de LF.¹⁵⁴ Las mutaciones en este gen, que codifica una proteína anti-apoptótica, tienen consecuencias desconocidas actualmente y se encuentran localizadas principalmente en los dominios funcionales BH1, BH2 y BH3 de la proteína.¹⁷⁰

Por otro lado, las células tumorales adquieren la capacidad de proliferar descontroladamente evitando la acción de oncogenes y genes supresores de tumores, principalmente como consecuencia de la delección o mutación de los mismos. El ejemplo más característico es el gen *TP53*, un gen supresor tumoral alterado en la mayoría de las neoplasias, mutado con una frecuencia próxima al 5-6% en el caso del LF. Tanto la delección como las mutaciones en *TP53* confieren mal pronóstico en la mayoría de los casos, incluido el LF.^{171;172}

3.3.6. Mutaciones en factores de transcripción

En el LF son cuatro los genes codificantes de factores de transcripción más frecuentemente mutados: *STAT6* (descrito en el apartado de la vía JAK-STAT), *MEF2B*, *FOXO1* y *EBF1*. El gen *MEF2B* se encuentra alterado en el 10-15% de los casos, y codifica un activador de la transcripción involucrado en el proceso de regulación epigenética. La proteína MEF2B no es por tanto un modulador epigenético, sino que tiene como función el reclutamiento de enzimas deacetilasas y demetilinas para promotores y *enhancers* participando así en

los procesos epigenéticos, además de ser un potente activador del gen *BCL6*.¹⁷² Las mutaciones en este gen suelen ser de ganancia de función y alteran principalmente su habilidad para unirse tanto al ADN como a su co-represor o modulador de la actividad *CABIN1*.^{154;173;174}

El gen *FOXO1* está mutado en menor frecuencia en LF, aproximadamente en el 5-10% de los casos. Las mutaciones en este gen son principalmente de ganancia de función y tienen como consecuencia la retención de la proteína en el núcleo y el aumento de su actividad. *FOXO1* codifica un factor de transcripción imprescindible para mantener los programas génicos de la DZ en las células B CG y además coopera con *BCL6*, regulador del programa genético de la célula B CG.^{153;175;176}

Por último, el gen *EBF1* aparece mutado en el 10% de los casos de LF, estando sus mutaciones agrupadas principalmente en su dominio de unión al ADN.² El factor de transcripción codificado por *EBF1* está involucrado en el desarrollo de la célula B uniéndose a una secuencia consenso del tipo 5'TCCCNNGGGA.^{177;178} Las mutaciones en este gen parecen ser de pérdida de función ya que se observa una reducción en la expresión de sus genes diana.¹⁵⁶

4. LINFOMA FOLICULAR TRANSFORMADO

4.1. Progresión, transformación y evolución clonal

Como se ha comentado previamente, el LF es considerado una enfermedad incurable y, por tanto, la progresión tras el tratamiento es muy frecuente, hecho que sucede en la mayoría de los casos. Por ello, uno de los mayores retos en la actualidad es determinar al diagnóstico aquellos pacientes con LF que van a progresar, con o sin TH, o recaer tras el tratamiento. Para ello son importantes los estudios sobre evolución clonal, pero la dificultad de acumular un gran número de biopsias secuenciales que reflejen los distintos escenarios de la enfermedad hace que el número de estudios de este tipo sea relativamente pequeño. A pesar de ello, los análisis del reordenamiento V(D)J, patrón de HMS y la incorporación de la secuenciación de nueva generación o NGS (*next generation sequencing*) han aportado evidencias claras de la existencia de un origen común para todas las etapas de la enfermedad, es decir, un clon ancestral común que recibe el nombre de clon progenitor común o CPC (*common progenitor cell*).^{156;179-183} Este CPC presenta la peculiaridad de retener la capacidad de auto-renovarse así como de continuar diversificándose a medida que la enfermedad evoluciona.^{2;180;184} Además, el CPC comparte el mismo reordenamiento V(D)J y mismo *breakpoint* en la t(14;18) con el resto de clones emergentes que darán lugar tanto al LF sintomático como a las posibles recaídas o TH, demostrando que son clonalmente relacionados.⁶⁵ Por tanto, la identificación de la relación clonal entre las distintas biopsias, ya sea a través del reordenamiento V(D)J o de la t(14;18), es imprescindible para considerar que se trata de una recaída o una transformación del mismo clon y no un linfoma secundario no clonalmente relacionado.^{182;185}

Con el fin de reconstruir la relación clonal entre el diagnóstico y las biopsias sucesivas del mismo paciente, se han llevado a cabo árboles filogenéticos con biopsias pareadas que reflejan distintas teorías de evolución clonal en el LF.^{156;180;182;183;186} El análisis de estas biopsias pareadas permite observar la existencia de alteraciones *driver* tempranas y compartidas por ambas muestras tumorales, como es el caso de la t(14;18) y las mutaciones en reguladores epigenéticos, así como un conjunto de mutaciones propias y características de cada una de las biopsias.⁶⁵ En base a esto, comúnmente se habla de dos posibles modelos de evolución clonal (Figura 16):

- **lineal o secuencial**, en el cual los clones emergen directamente del clon primario manteniendo todas sus alteraciones además de las adquiridas en episodios previos, es decir, cada momento evolutivo incluye las alteraciones adquiridas en la recaída anterior;
- **divergente o ramificado** a partir del CPC, con adquisición de alteraciones diferentes y propias del clon correspondiente de cada etapa evolutiva del LF.

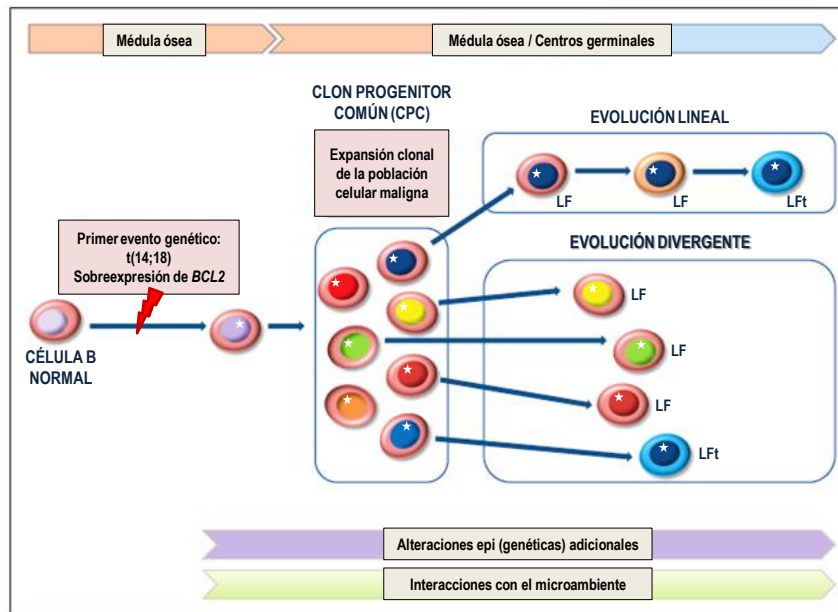


Figura 16. Representación esquemática de los diferentes modelos de evolución clonal hasta dar lugar al linfoma folicular (LF) y/o linfoma folicular transformado (LFt). Figura adaptada de *The routes for transformation of follicular lymphoma* (Okosun J. 2016). La t(14;18) es considerada el primer evento genético en la patogénesis del LF y tiene lugar en la médula ósea. A partir de aquí, la adquisición de eventos genéticos adicionales genera un reservorio de células iniciadoras de tumor con proliferación clonal, denominado clon progenitor común (CPC). A partir de este CPC podemos hablar de modelo lineal, que implica la adquisición secuencial de alteraciones que darán lugar tanto al linfoma indolente (LF) como al linfoma agresivo (LFt) pudiéndose observar todas ellas en última instancia en el LFt; o modelo divergente, en el cual del CPC surgirán subclones que darán lugar por un lado al LF y por otro al LFt, manifestando diferentes comportamientos en función del clon que debute en ese momento.

A pesar de la controversia entre los distintos estudios, la evolución divergente se antepone sobre el modelo lineal como patrón de evolución clonal en el LF, ya que estudios recientes demuestran la presencia indetectable de las mutaciones características de la transformación en la biopsia inicial del LF.¹⁸³ Sin embargo, el mismo estudio muestra como en los casos en los cuales existe progresión temprana sin TH parece observarse una evolución lineal a partir del clon dominante del momento del diagnóstico.^{154;183}

En resumen, a día de hoy no está clara la evolución del clon tumoral ni tampoco la naturaleza del mismo, sin olvidar el intenso tráfico de subclones entre compartimentos hematopoyéticos y la heterogeneidad espacial intratumoral que existe en los casos de LF.^{187;188}

4.2. Definición de transformación y epidemiología

Aunque el LF es considerado una enfermedad de carácter indolente, un suceso relevante en la historia natural del mismo es la transformación histológica (TH) a un linfoma con histología y comportamiento clínico propios de un linfoma agresivo, generalmente del tipo de LDCBG (80%).^{55;189} Este proceso de TH también puede darse, aunque en menor frecuencia, hacia un linfoma del tipo de linfoma de Burkitt o bien a un linfoma con

características intermedias entre el linfoma de Burkitt y el LDCBG, clasificados como linfomas de célula B de alto grado con traslocaciones en *BCL2* (18q21), *MYC* (8q24) y/o *BCL6* (3q27) en la revisión de 2016 de la OMS.⁵⁴ A pesar de que esta TH es predominante en los LF, hay otros tipos de neoplasias de célula B indolentes en los que ocurre, como son la leucemia linfática crónica (LLC) o linfoma de linfocitos pequeños (LLP),¹⁹⁰⁻¹⁹² el linfoma de tejido linfoide asociado a mucosas (MALT),^{193;194} la macroglobulinemia de Waldenström (MW) o linfoma linfoplasmocítico,¹⁹⁵ y el linfoma de Hodgkin con predominio linfocítico nodular (LH-PLN).¹⁹⁶

La definición de transformación de linfoma indolente a linfoma de alto grado está basada en criterios histológicos, considerándose por tanto el *gold-standard* siempre que sea posible llevar a cabo la biopsia del tumor. En base a ello, definimos TH como el aumento de células grandes (centroblastos) infiltrando difusamente los ganglios y borrando la arquitectura folicular, es decir, la progresión del LF grados 1, 2 y 3A a linfoma de alto grado, en ocasiones en presencia de histología residual de bajo grado (linfoma compuesto o *composite*).^{110;197} La progresión de grados 1 y 2 a grado 3A no debe considerarse TH a pesar de ser un suceso frecuente en el curso del LF.

Además de la biopsia como evidencia de TH, una definición inequívoca de transformación requiere la confirmación de una relación clonal entre el LF indolente y el linfoma agresivo subsiguiente, que se puede establecer mediante técnicas de biología molecular como se ha comentado en epígrafes previos.

A pesar de que el diagnóstico histológico es el *gold-standard*, su uso exclusivo puede llevar a falsos negativos por varias razones: inaccesibilidad del tumor que impida la realización de la biopsia, falta de pruebas metabólicas, como puede ser el PET/TC, que indiquen la adenopatía a biopsiar y/o la diseminación o heterogeneidad espacial del tumor que haga poco representativa del mismo una única biopsia.^{110;197-199} Por ello, en aquellas ocasiones en las que la biopsia no sea posible o sea poco representativa, es importante llevar a cabo un diagnóstico basado en la combinación de criterios clínicos de alto riesgo como son la elevación rápida de los niveles de LDH en suero de 2 a 3 veces por encima de los valores normales, el crecimiento rápido de áreas nodales o la aparición de nuevas áreas extranodales, empeoramiento en el estado funcional del paciente, aparición de nuevos síntomas B o hipercalcemia.^{2;110} Además, se puede observar también una aceleración de la cinética de proliferación, por ejemplo, en el aumento de la expresión de Ki-67 dentro del tumor.^{189;200} Sin embargo, no hay consenso en cuanto a los criterios clínicos variando generalmente entre los distintos estudios propuestos.^{199;201-203} Además, en ocasiones se pueden observar varios de estos factores en progresiones o en recaídas del LF sin que haya TH.

Recientemente, la inclusión de la ¹⁸F]fluorodesoxiglucosa (18F-FDG) tanto en la tomografía por emisión de positrones como en la tomografía computerizada (PET/TC) ha demostrado tener utilidad diagnóstica en la

transformación, permitiendo además guiar la biopsia. Esto se debe a que el alto valor de captación estandarizado (SUV) se correlaciona con una histología más agresiva.²⁰⁴⁻²⁰⁷

La incidencia del LF transformado (LFt) no está bien establecida a día de hoy debido principalmente a los diferentes criterios utilizados para definir y clasificar la transformación, la variabilidad en el tamaño de las series de pacientes, así como las diferencias en el tiempo de seguimiento entre los distintos estudios.^{109;111;199;201-203;208-210} Teniendo en cuenta los datos de estudios previos, la incidencia estimada por la OMS del LFt es del 25-30% de los casos,⁵⁴ tanto en la era rituximab como en la era pre-rituximab. El riesgo de transformación es del 3% por año, viéndose reducido en los últimos estudios enmarcados en la era rituximab y estando sin resolver la controversia en cuanto a la presencia o no de una meseta que mantenga el riesgo de TH constante a partir de un pico en un momento determinado.^{110;186;197;202;203}

A pesar de la mejora en las técnicas moleculares y el aumento de estudios centrados en la TH, aún no está clara la etiología de dicho proceso ni su patogénesis, habiéndose identificado factores de riesgo asociados a la TH pero sin ser reproducibles entre los distintos estudios, haciéndolos inaplicables en la práctica diaria.

4.3. Célula de origen y patogénesis de la TH

De la misma forma que el LDCBG *de novo* se clasifica en función del patrón de expresión de su célula de origen en tipo CGB (expresión similar a las células B CG) y tipo ABC (*activated-B cell*, expresión similar a las células B activadas), el LF con transformación a LDCBG puede clasificarse de la misma forma, sin diferencias en supervivencia en función de la célula de origen. Dado que el LFt resulta de la expansión clonal de un clon subyacente del LF con un inmunofenotipo similar al de las células B CG normales, es de esperar que la mayoría de los LFt pertenezcan al subtipo CGB, hecho que sucede en aproximadamente el 80% de los casos.^{55;110;211;212} Estudios de expresión génica de alta resolución han demostrado la presencia de un grupo de aproximadamente el 20% de los casos con LFt con un patrón de expresión similar al subtipo ABC y alteraciones génicas que les asemejan con el LDCGB ABC *de novo*, como alteraciones en las vías de señalización BCR/NF- κ B.^{212;213} Además, este grupo de LFt de tipo ABC se caracteriza por presentar frecuencias bajas de la t(14;18), lo que lleva a pensar que deriven de clones de LF sin dicha traslocación.^{53;55;212} En cualquiera de los casos, existe una relación clonal entre la biopsia del LF inicial y la TH, siendo por tanto linfomas clonalmente relacionados.

Por otro lado, en términos generales, el LFt presenta un mayor número de mutaciones somáticas, así como inserciones y deleciones pequeñas, CNAs y traslocaciones que el LF indolente del que precede o con el que comparte un CPC.^{182;183;189} Como consecuencia de este gran número de alteraciones que caracterizan al LFt, tendrá lugar la activación de determinados oncogenes, como por ejemplo *MYC*, e inactivación de genes supresores de tumores, como *TP53* o *CDKN2A/B*, que darán lugar a la TH del linfoma indolente a linfoma

agresivo.^{182;214-217} Un estudio reciente describe la presencia de algunas o la mayoría de estas alteraciones génicas observadas en las biopsias de la transformación ya en el momento del diagnóstico del LF en frecuencias muy bajas o casi indetectables (<1%), sugiriendo que una sola alteración no es suficiente para desencadenar la TH de forma similar a lo que ocurre con la t(14;18) en la fase indolente del LF.¹⁸³ Por tanto, a día de hoy, se desconoce si la TH depende de determinados sucesos genómicos sucesivos o es necesario que coexistan determinadas alteraciones que den lugar al fenotipo agresivo.¹⁸⁹

La controversia entre los distintos estudios así como el conjunto de cuestiones aún sin resolver hace que, a pesar de la introducción de las nuevas técnicas moleculares y el desarrollo de estudios recientes que han contribuido a ampliar el conocimiento sobre posibles genes involucrados en la transformación, la patogénesis de dicho proceso siga siendo una cuestión sin resolver. Por ello, son necesarios estudios adicionales más completos que integren técnicas de secuenciación a gran escala, completados con estudios de genómica funcional.¹⁸⁹

4.4. Factores asociados a TH

Uno de los mayores retos en el ámbito del LF en las últimas décadas es identificar aquellos pacientes susceptibles de TH en el momento del diagnóstico como LF.¹⁸⁹ Actualmente no se ha establecido ningún factor que permita predecir con precisión qué pacientes van a sufrir transformación a linfoma agresivo, ya que los factores o biomarcadores que se describen a continuación carecen de validación en términos generales. Además, la variabilidad en cuanto a las de técnicas utilizadas para su análisis así como en el manejo de los pacientes al diagnóstico, conlleva una escasa reproducibilidad entre los distintos grupos, por lo que su implementación en la práctica clínica parece un desafío a día de hoy.

4.4.1. Factores de riesgo clínicos

Los factores clínicos comúnmente asociados con procesos de transformación incluyen un estado funcional deteriorado, edad avanzada, niveles elevados de $\beta 2$ -m en suero, hemoglobina baja, LDH en suero elevada 2-3 veces por encima de los valores normales y progresión clínica temprana de la enfermedad.²¹⁸ El principal factor de riesgo de TH es el FLIPI de alto riesgo.^{109;199;208;210} Si bien, no es un buen factor predictor ya que hay una proporción de pacientes con LF que presentan FLIPI de bajo riesgo al diagnóstico y experimentan TH, mientras que algunos pacientes con FLIPI de alto riesgo nunca llegan a sufrir transformación.^{109;183;210} Estas variables clínicas asociadas en un principio a TH, también son en general factores pronósticos del LF, por lo que su aplicación como factores predictivos de transformación no está clara a día de hoy.¹⁸⁹

Por otro lado, se ha especulado sobre el efecto del manejo terapéutico de los pacientes con LF al diagnóstico en el riesgo de transformación a linfoma agresivo, teorizando la posibilidad de que la transformación surja a través de presiones selectivas.¹⁸⁹ En este sentido, algunos estudios sugieren una asociación del tratamiento temprano con menor riesgo de TH, es decir, aquellos pacientes que se mantienen en “esperar y ver” (abstención terapéutica) presentan mayor riesgo de transformarse a un linfoma agresivo, indicando una acción protectora principalmente del rituximab frente a la TH.^{109;219} El ensayo fase 3 realizado por el grupo de Ardeshtna KM. en el cual llevan a cabo una asignación aleatoria de pacientes en dos grupos, terapia temprana con rituximab y “esperar y ver”, contradice dicha hipótesis, ya que no observaron diferencias ni en el tiempo de transformación ni en el riesgo o incidencia de TH entre ambos, posiblemente debido al tiempo de seguimiento.⁹²

Por último, la respuesta al tratamiento en primera línea del LF también se ha visto asociada a TH en distintos estudios en la era rituximab y pre-rituximab,²²⁰ pero también se ha observado TH en pacientes que responden a primera línea, e incluso en pacientes que no reciben tratamiento.^{109;201;210}

4.4.2. Factores de riesgo biológicos

Con mucha frecuencia los estudios se contradicen en lo que respecta a los factores biológicos involucrados en TH, asociando las mismas características a riesgo favorable en unos estudios y desfavorable en otros. Sin embargo, en base al conocimiento acumulado hasta la fecha, los diversos estudios colectivamente defienden que la transformación a linfoma agresivo no tiene lugar como consecuencia de un único evento genético o epigenético, sino que es necesaria la adquisición de un conjunto de aberraciones o alteraciones diferentes. Por tanto, todos los estudios están de acuerdo en el incremento de la complejidad genética del tumor en el momento de la transformación respecto a las biopsias del linfoma indolente como consecuencia de variables intrínsecas y/o extrínsecas.²¹³ Los factores biológicos al diagnóstico asociados de forma recurrente a TH se resumen en la tabla 9.

▪ Hallazgos patológicos

En relación con los hallazgos patológicos, la clasificación del LF se ha asociado con transformación, de forma que aquellos pacientes con grado 3A parecen estar fuertemente relacionados con una mayor incidencia de TH en algunos estudios, a pesar de que en otros no se observe dicha asociación.^{199;212;221} Esto se debe a que, cuanto mayor es el número de centroblastos presente en la biopsia del LF, más agresivo es el tumor y mayor es la probabilidad de que se transforme a LDCBG. En la misma línea, la expresión positiva de IRF4 por IHQ ha sido identificada como un factor independiente de TH temprana principalmente asociado al LF tipo LDCBG ABC, además de a menor supervivencia en el LF.²¹²

Tabla 9. Factores biológicos al diagnóstico asociados de forma recurrente a transformación histológica (TH).

Categoría funcional	Variable	Riesgo de transformación	Referencias
Hallazgos patológicos	Grado 3A	Incrementado	199; 212; 221
	Expresión positiva de IRF4	Incrementado	212
Alteraciones cromosómicas	Aumento de complejidad genómica	Incrementado	183
	Pérdidas en 1p, 6q y 9p	Incrementado	142; 184
	Ganancias del cromosoma 2, 5 y 3q	Incrementado	142; 184
	Traslocaciones de <i>MYC</i> (también <i>amplificaciones</i> y <i>mutaciones</i>)	No concluyente	55; 182; 212; 215; 222
	Traslocaciones de <i>BCL6</i> (también <i>amplificaciones</i> y <i>mutaciones</i>)	Incrementado	10; 223-227
Mutaciones somáticas	Gen <i>TP53</i> (alteraciones bialélicas: <i>mutación</i> + <i>delección</i>)	No concluyente	171; 182; 189; 229
	Gen <i>BCL2</i>	No concluyente	230-232
	Gen <i>FAS</i>	Incrementado	182; 233
	Genes <i>TNFAIP3</i> y <i>MYD88</i>	Incrementado	2; 156; 183; 213
	Gen <i>FOXO1</i>	No concluyente	182
Microambiente	Localización intrafolicular de células T CD4+	Incrementado	234
	Número elevado de células T PD1+	Disminuido	235
	Número elevado de células Treg FOXP3+	Disminuido	236; 237
	Aumento de angiogénesis	Incrementado	238

▪ Alteraciones cromosómicas

En lo que respecta a las alteraciones a gran escala o alteraciones cromosómicas, la principal cuestión sin resolver es si son alteraciones concretas lo que confiere mayor riesgo de transformación o si es simplemente la adquisición de mayor complejidad genómica, es decir, un mayor número de alteraciones cromosómicas, lo que realmente está asociado con pronóstico adverso y, por tanto, mayor riesgo de TH. Por un lado, el número de reordenamientos estructurales y CNAs se ha visto incrementado en el LFt respecto al LF en progresión sin TH o libres de evento durante un seguimiento de 5 años desde el diagnóstico.¹⁸³ Por otro lado, diversos estudios identifican alteraciones cromosómicas concretas como las pérdidas en 1p, 6q y 9p (incluida la delección de *CDKN2A/B*) o las ganancias relacionadas con el cromosoma 2 (incluida la amplificación del proto-oncogen *REL*, que forma parte del complejo NF- κ B), 5 y 3q, las que se han visto asociadas con mayor riesgo de TH.^{142;184}

Aunque las traslocaciones que involucran al gen *MYC* (8q24) son raras en el LF, sin embargo, se observan con frecuencia en el LFt y se consideran un evento conductor de la transformación a linfoma agresivo, a pesar de que su papel como factor predictor y pronóstico no está claro a día de hoy, siendo necesario su estudio en una serie mayor.^{55;182;212;215} Este proto-oncogen, igual que otros como *BCL2* o *BCL1*, se trasloca recurrentemente al loci IG (14q32),²²² y su actividad desregulada como consecuencia de la traslocación, mutaciones puntuales o ganancias y amplificaciones se observa en aproximadamente en el 30% de los casos de LFt. Estas alteraciones confieren a la célula tumoral múltiples ventajas debido a su función pleiotrópica en crecimiento celular, metabolismo e inestabilidad genética.¹⁸²

Las traslocaciones, o en ocasiones amplificaciones, de *BCL6* (3q27) son más frecuentes en LFt que en el LF sin TH, demostrando su implicación en un mayor riesgo de transformación a linfoma agresivo, aunque no de manera aislada.^{10;223} *BCL6* codifica un factor de transcripción involucrado en la regulación de la zona oscura del CG que funciona como un “interruptor” que, cuando está apagado, da paso a la diferenciación de la célula B. Este proto-oncogen, a diferencia del resto, no se trasloca sólo al loci IG, conociéndose hasta 20 *partners* no-IG distintos que remplazan su promotor sin alterar la estructura del gen.²²³⁻²²⁵ Las mutaciones en *BCL6* también se han descrito en linfomas agresivos y asociado a TH, especialmente mutaciones en su región 5' UTR, región responsable de su regulación negativa.²²⁶⁻²²⁸ Su desregulación como consecuencia de cualquiera de las alteraciones es más frecuente en linfomas agresivos, pudiendo distinguir un subgrupo biológico en el LF con mayor tendencia a TH.

▪ **Mutaciones somáticas**

En el momento de la transformación están presentes una serie de genes frecuentemente mutados comunes a los observados en el momento del diagnóstico del LF, principalmente genes involucrados en regulación epigenética como *KMT2D*, *CREBBP* y *EZH2*. Además, se han observado mutaciones en genes que se encuentran en muy baja frecuencia en el LF o incluso ausentes, principalmente mutaciones o alteraciones en proto-oncogenes o genes supresores de tumores característicos de tumores agresivos.²¹³ Algunos genes descritos como posibles factores de riesgo de TH y, por tanto, con mutaciones presentes en mayor frecuencia en el LFt, serán detallados a continuación.

Uno de los genes más frecuentemente asociado con TH es el gen *TP53*, localizado en la región 17p13.1, cuyas mutaciones son poco frecuentes en el momento del diagnóstico de LF (5%) pero son muy comunes en el momento de la transformación, aproximadamente en el 25-30% de los casos.^{182;189} Mientras que las mutaciones en el LF ocurren generalmente en ausencia de delección del otro alelo, en la TH se presentan alteraciones bialélicas de *TP53*, ya sea a través de su supresión, pérdida de heterocigosidad o mutaciones somáticas, afectando a ambas copias del mismo.^{171;182;229}

La HMSA, descrita en epígrafes previos, en genes no-IG incrementa en la transformación.²³⁰ En particular, las mutaciones en el gen *BCL2*, susceptible de HMSA, incrementan en el momento de la transformación y se correlacionan con peor pronóstico. Por tanto, este gen, además de encontrarse traslocado en la mayoría de los casos de LF con o sin TH, es susceptible de mutaciones somáticas asociadas a TH en algunos estudios,^{231;232} a pesar de que en otros no se observó dicha asociación.^{119;170;182} Además, en el estudio de Correia C *et al.* se observa un incremento en la frecuencia de sus mutaciones entre la biopsia del diagnóstico y de la transformación.²³² La discrepancia entre los diferentes estudios en cuanto a las mutaciones somáticas en *BCL2* podría atribuirse a las diferencias en las técnicas utilizadas para la detección de mutaciones somáticas.

A diferencia de *TP53* y *BCL2*, cuyas alteraciones son poco frecuentes al diagnóstico, las mutaciones en el gen *FAS* sí lo están en aproximadamente el 6-7% de los casos en el momento del diagnóstico, siendo mostradas principalmente por los pacientes con LF que experimentan transformación a linfoma agresivo. Esto indica el posible papel de este gen en la patogénesis de la transformación, actualmente desconocido.^{182;233}

La afectación de genes implicados en la vía de proliferación celular NF-κB, como los genes *TNFAIP3* y *MYD88*, también parece ser importante en la transformación del LF.²¹³ *MYD88* codifica una proteína adaptadora de receptores *Toll-like*, cuyas mutaciones se observan principalmente en el LF en progresión o transformado generalmente a LDCBG-ABC.^{156;183} Las mutaciones en este gen son exclusivas por tanto de la biopsia de la transformación, mientras que las mutaciones en *TNFAIP3* pueden observarse en frecuencias bajas al diagnóstico, y tienen lugar principalmente en el dominio TIR de la proteína.²

Por último, varios estudios describen una frecuencia incrementada de las mutaciones en el gen *FOXO1* en el momento de la transformación respecto al diagnóstico o al LF sin TH, en más del 15% de los casos.¹⁸² En el caso de *FOXO1*, la reproducibilidad de los resultados es deficiente actualmente, siendo pocos los estudios que involucran a dicho gen en el proceso de TH.

La falta de reproducibilidad y la controversia entre los distintos estudios, probablemente debido a la falta de estudios que analicen biopsias en las distintas etapas de la enfermedad, hace que en la actualidad no haya marcadores consistentes de TH.

▪ **Microambiente**

El microambiente parece tener un potencial papel en el control, desarrollo y proliferación de los tumores y, por tanto, parece razonable pensar que esté implicado en la transformación del LF. Aunque la asociación no es uniforme en términos de distribución de las células inmunitarias que forman parte del microambiente, parece observarse una frecuencia más elevada de células T CD4+ fundamentalmente con localización intrafolicular en aquellos pacientes con LF que experimentan TH.²³⁴ Por el contrario, el incremento de células T con expresión de PD1, un receptor implicado en la supresión inmunológica, se ha visto asociado con un riesgo reducido de TH.²³⁵

Otro componente importante del microambiente que se ha visto asociado con transformación son las células T reguladoras con expresión de FOXP3. El número elevado de este tipo celular en el tumor se asocia con menor riesgo de TH y con una mejora en la supervivencia del LF.^{236;237} Por último, se sabe con certeza que la vascularización o angiogénesis incrementada en el tumor supone un mayor riesgo de TH, además de una peor supervivencia.²³⁸

La información tan limitada en lo que respecta al microambiente deja clara la necesidad de estudios a gran escala para comprender cómo el microambiente regula o controla la transformación, ya que conocer estos mecanismos permitiría el desarrollo o aplicación de terapias dirigidas al sistema inmunitario que mejoren el pronóstico de los pacientes con LFt.

4.5. Pronóstico y tratamiento del LFt

Debido a la escasez de estudios prospectivos que evalúen la eficacia de los distintos tratamientos en el LFt, actualmente los pacientes que sufren TH a linfoma agresivo son manejados como un LDCBG *de novo* terapéuticamente hablando. A pesar de ello, los pacientes con LFt son considerados con peor curso clínico, menor respuesta al tratamiento y menor supervivencia que los pacientes con LDCBG *de novo*.¹⁹⁷ A pesar de ello, el pronóstico de estos pacientes ha variado en los últimos años con la introducción del rituximab. Este anticuerpo monoclonal asociado a quimioterapia ha mejorado el pronóstico tanto de los pacientes con LDCBG *de novo*,^{239;240} como de los pacientes con LFt, prolongando la supervivencia de este último grupo hasta una media de 4-5 años.^{110;197;203;241} En cuanto al tiempo hasta la TH desde el diagnóstico como LF, aunque no está claro cuál es su mecanismo, el estudio de Link BK *et al.* muestra que la transformación temprana (<18 meses desde el diagnóstico) se asocia significativamente con una peor supervivencia en comparación con aquellos pacientes con TH tardía (> 18 meses), si bien no existe una definición para considerar TH temprana o tardía.^{197;203}

Respecto a la actitud terapéutica ante los pacientes con TH es importante tener en cuenta si han recibido o no tratamiento previo para el LF, por lo que se ha propuesto un algoritmo terapéutico simplificado para los pacientes con LFt (Figura 17). Este algoritmo recomienda tratar con R-CHOP a los pacientes con LFt que no han recibido este esquema terapéutico en la etapa de linfoma indolente y a aquellos en actitud “esperar y ver” y/o tratados con RT.²⁴² Ante los buenos resultados obtenidos con esta terapia en pacientes con TH, actualmente se ha cuestionado la necesidad de la consolidación con auto-TPH en este grupo, ya que podría obviarse en pacientes con LFt en respuesta completa tras R-CHOP.^{242;243} Sin embargo, para aquellos pacientes que recibieron tratamiento con R-CHOP antes de la TH son recomendados los regímenes basados en platino, es decir, tratamientos de rescate de segunda línea para el LDCBG (R-ESHAP o similar), contemplando la consolidación con auto-TPH en aquellos jóvenes con respuesta al tratamiento de rescate.^{241;242;244;245}

El papel del alo-TPH en los pacientes con LFt se ha analizado en series pequeñas de pacientes y no está claro a día de hoy debido a la alta mortalidad relacionada con el trasplante observada en la mayoría de estudios. La posibilidad de mejora mediante el uso de acondicionamiento de intensidad reducida en lugar del acondicionamiento mieloablativo normalmente utilizado, quizá permita mejores resultados en un futuro.²⁴⁶⁻²⁴⁹

Los pacientes con LFt a menudo son excluidos de los ensayos clínicos prospectivos, por dicha razón la información sobre la eficacia de los nuevos fármacos en el tratamiento de estos pacientes es muy reducida actualmente.¹¹⁰ Por ello, aumentar el conocimiento de la biología de la transformación permitirá poner en marcha ensayos clínicos centrados en este grupo de pacientes que permitirán implementar nuevas estrategias terapéuticas que mejoren el pronóstico del LFt

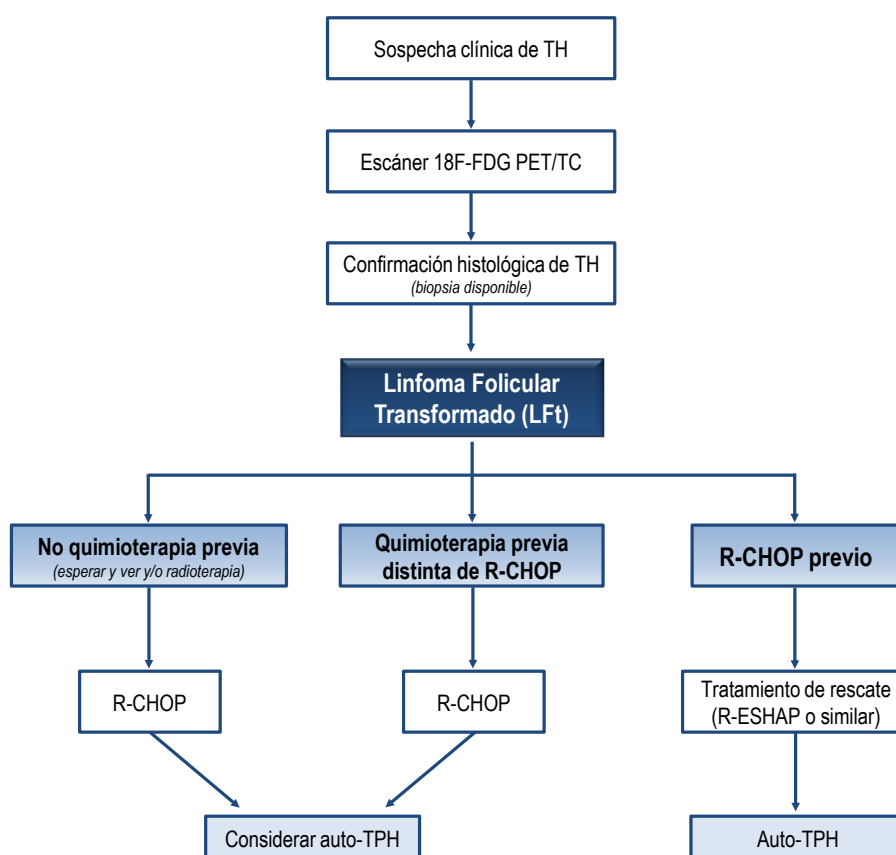


Figura 17. Algoritmo terapéutico simplificado para el LF transformado (LFt). TH, transformación histológica; ¹⁸F-FDG, ¹⁸[F]fluorodesoxiglucosa; PET/TC, tomografía por emisión de positrones/tomografía computerizada; R-CHOP, rituximab - ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisona; Auto-TPH, trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos.

5. BIBLIOGRAFÍA

1. Kuppers R. Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nat.Rev.Cancer* 2005;5:251-262.
2. Lenz G, Pasqualucci L, Klein U et al. Malignant Lymphoma. *Biology and molecular pathogenesis.*; 2016.
3. MacLennan IC. Germinal centers. *Annu.Rev.Immunol.* 1994;12:117-139.
4. Klein U, la-Favera R. Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. *Nat.Rev.Immunol.* 2008;8:22-33.
5. De Silva NS, Klein U. Dynamics of B cells in germinal centres. *Nat.Rev.Immunol.* 2015;15:137-148.
6. Basso K, la-Favera R. Germinal centres and B cell lymphomagenesis. *Nat.Rev.Immunol.* 2015;15:172-184.
7. Schwickert TA, Lindquist RL, Shakhar G et al. In vivo imaging of germinal centres reveals a dynamic open structure. *Nature* 2007;446:83-87.
8. Victora GD, Schwickert TA, Fooksman DR et al. Germinal center dynamics revealed by multiphoton microscopy with a photoactivatable fluorescent reporter. *Cell* 2010;143:592-605.
9. Allen CD, Ansel KM, Low C et al. Germinal center dark and light zone organization is mediated by CXCR4 and CXCR5. *Nat.Immunol.* 2004;5:943-952.
10. Devan J, Janikova A, Mraz M. New concepts in follicular lymphoma biology: From BCL2 to epigenetic regulators and non-coding RNAs. *Semin.Oncol.* 2018
11. Borden P, Jaenichen R, Zachau HG. Structural features of transposed human VK genes and implications for the mechanism of their transpositions. *Nucleic Acids Res.* 1990;18:2101-2107.
12. Fripiat JP, Williams SC, Tomlinson IM et al. Organization of the human immunoglobulin lambda light-chain locus on chromosome 22q11.2. *Hum.Mol.Genet.* 1995;4:983-991.
13. Matsuda F, Ishii K, Bourvagnet P et al. The complete nucleotide sequence of the human immunoglobulin heavy chain variable region locus. *J.Exp.Med.* 1998;188:2151-2162.
14. Van Dongen JJ, Langerak AW, Bruggemann M et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia* 2003;17:2257-2317.
15. Edelman GM. Antibody structure and molecular immunology. *Science* 1973;180:830-840.
16. Di Noia JM, Neuberger MS. Molecular mechanisms of antibody somatic hypermutation. *Annu.Rev.Biochem.* 2007;76:1-22.
17. Alt FW, Blackwell TK, Yancopoulos GD. Development of the primary antibody repertoire. *Science* 1987;238:1079-1087.
18. Tonegawa S. Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 1983;302:575-581.
19. Goossens T, Klein U, Kuppers R. Frequent occurrence of deletions and duplications during somatic hypermutation: implications for oncogene translocations and heavy chain disease. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1998;95:2463-2468.
20. Rajewsky K. Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature* 1996;381:751-758.
21. Yan CT, Boboila C, Souza EK et al. IgH class switching and translocations use a robust non-classical end-joining pathway. *Nature* 2007;449:478-482.
22. Berlot G, Rossini P, Turchet F. Biology of immunoglobulins. *Transl.Med.UniSa.* 2015;11:24-27.
23. Ghielmini M, Montoto S. Lymphomas. *Essentials for Clinicians.*; 2016.
24. Seifert M, Kuppers R. Determining the Origin of Human Germinal Center B Cell-Derived Malignancies. *Methods Mol.Biol.* 2017;1623:253-279.

25. Pasqualucci L, Bhagat G, Jankovic M et al. AID is required for germinal center-derived lymphomagenesis. *Nat.Genet.* 2008;40:108-112.
26. McBride KM, Gazumyan A, Woo EM et al. Regulation of class switch recombination and somatic mutation by AID phosphorylation. *J.Exp.Med.* 2008;205:2585-2594.
27. Wang Q, Oliveira T, Jankovic M et al. Epigenetic targeting of activation-induced cytidine deaminase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2014;111:18667-18672.
28. Meng FL, Du Z, Federation A et al. Convergent transcription at intragenic super-enhancers targets AID-initiated genomic instability. *Cell* 2014;159:1538-1548.
29. Qian J, Wang Q, Dose M et al. B cell super-enhancers and regulatory clusters recruit AID tumorigenic activity. *Cell* 2014;159:1524-1537.
30. Mu Y, McBride KM. Targeting mutagenesis in B cells: Phosphorylation goes beyond AID association. *Mol.Cell Oncol.* 2018;5:e1432259.
31. Klein IA, Resch W, Jankovic M et al. Translocation-capture sequencing reveals the extent and nature of chromosomal rearrangements in B lymphocytes. *Cell* 2011;147:95-106.
32. Chiarle R, Zhang Y, Frock RL et al. Genome-wide translocation sequencing reveals mechanisms of chromosome breaks and rearrangements in B cells. *Cell* 2011;147:107-119.
33. Pannunzio NR, Lieber MR. AID and Reactive Oxygen Species Can Induce DNA Breaks within Human Chromosomal Translocation Fragile Zones. *Mol.Cell* 2017;68:901-912.
34. Seifert M, Scholtysik R, Kuppers R. Origin and pathogenesis of B cell lymphomas. *Methods Mol.Biol.* 2013;971:1-25.
35. Bende RJ, Smit LA, van Noesel CJ. Molecular pathways in follicular lymphoma. *Leukemia* 2007;21:18-29.
36. Migliazza A, Martinotti S, Chen W et al. Frequent somatic hypermutation of the 5' noncoding region of the BCL6 gene in B-cell lymphoma. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1995;92:12520-12524.
37. Pasqualucci L, Migliazza A, Fracchiolla N et al. BCL-6 mutations in normal germinal center B cells: evidence of somatic hypermutation acting outside Ig loci. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1998;95:11816-11821.
38. Mottok A, Renne C, Seifert M et al. Inactivating SOCS1 mutations are caused by aberrant somatic hypermutation and restricted to a subset of B-cell lymphoma entities. *Blood* 2009;114:4503-4506.
39. Schuetz JM, Johnson NA, Morin RD et al. BCL2 mutations in diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia* 2012;26:1383-1390.
40. Pasqualucci L, la-Favera R. The genetic landscape of diffuse large B-cell lymphoma. *Semin.Hematol.* 2015;52:67-76.
41. me-Thomas P, Maby-El HH, Monvoisin C et al. Human mesenchymal stem cells isolated from bone marrow and lymphoid organs support tumor B-cell growth: role of stromal cells in follicular lymphoma pathogenesis. *Blood* 2007;109:693-702.
42. Guilloton F, Caron G, Menard C et al. Mesenchymal stromal cells orchestrate follicular lymphoma cell niche through the CCL2-dependent recruitment and polarization of monocytes. *Blood* 2012;119:2556-2567.
43. Tsujimoto Y, Cossman J, Jaffe E, Croce CM. Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* 1985;228:1440-1443.
44. Tsujimoto Y, Finger LR, Yunis J, Nowell PC, Croce CM. Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science* 1984;226:1097-1099.
45. Tsujimoto Y, Gorham J, Cossman J, Jaffe E, Croce CM. The t(14;18) chromosome translocations involved in B-cell neoplasms result from mistakes in VDJ joining. *Science* 1985;229:1390-1393.
46. Cleary ML, Sklar J. Nucleotide sequence of a t(14;18) chromosomal breakpoint in follicular lymphoma and demonstration of a breakpoint-cluster region near a transcriptionally active locus on chromosome 18. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1985;82:7439-7443.

47. Ngan BY, Nourse J, Cleary ML. Detection of chromosomal translocation t(14;18) within the minor cluster region of bcl-2 by polymerase chain reaction and direct genomic sequencing of the enzymatically amplified DNA in follicular lymphomas. *Blood* 1989;73:1759-1762.
48. binger-Hegyi A, Hochreutener B, Abdou MT et al. High frequency of t(14;18)-translocation breakpoints outside of major breakpoint and minor cluster regions in follicular lymphomas: improved polymerase chain reaction protocols for their detection. *Am.J.Pathol.* 2002;160:823-832.
49. Nambiar M, Raghavan SC. Mechanism of fragility at BCL2 gene minor breakpoint cluster region during t(14;18) chromosomal translocation. *J.Biol.Chem.* 2012;287:8688-8701.
50. Rezuze WN, Abernathy EC, Tsongalis GJ. Molecular diagnosis of B- and T-cell lymphomas: fundamental principles and clinical applications. *Clin.Chem.* 1997;43:1814-1823.
51. Karube K, Guo Y, Suzumiya J et al. CD10-MUM1+ follicular lymphoma lacks BCL2 gene translocation and shows characteristic biologic and clinical features. *Blood* 2007;109:3076-3079.
52. Gu K, Fu K, Jain S et al. t(14;18)-negative follicular lymphomas are associated with a high frequency of BCL6 rearrangement at the alternative breakpoint region. *Mod.Pathol.* 2009;22:1251-1257.
53. Leich E, Salaverria I, Bea S et al. Follicular lymphomas with and without translocation t(14;18) differ in gene expression profiles and genetic alterations. *Blood* 2009;114:826-834.
54. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Revised 4th Edition.: IARC Press; 2017.
55. Lackraj T, Goswami R, Kridel R. Pathogenesis of follicular lymphoma. *Best.Pract.Res.Clin.Haematol.* 2018;31:2-14.
56. Huang JZ, Sanger WG, Greiner TC et al. The t(14;18) defines a unique subset of diffuse large B-cell lymphoma with a germinal center B-cell gene expression profile. *Blood* 2002;99:2285-2290.
57. Iqbal J, Sanger WG, Horsman DE et al. BCL2 translocation defines a unique tumor subset within the germinal center B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma. *Am.J.Pathol.* 2004;165:159-166.
58. Put N, Meeus P, Chatelain B et al. Translocation t(14;18) is not associated with inferior outcome in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2009;23:1201-1204.
59. Chen W, Miao Y, Wang R et al. t(14;18)(q32;q21) in chronic lymphocytic leukemia patients: Report of two cases and a literature review. *Oncol.Lett.* 2016;12:4351-4356.
60. Limpens J, Stad R, Vos C et al. Lymphoma-associated translocation t(14;18) in blood B cells of normal individuals. *Blood* 1995;85:2528-2536.
61. Dolken G, Illerhaus G, Hirt C, Mertelsmann R. BCL-2/JH rearrangements in circulating B cells of healthy blood donors and patients with nonmalignant diseases. *J.Clin.Oncol.* 1996;14:1333-1344.
62. McDonnell TJ, Korsmeyer SJ. Progression from lymphoid hyperplasia to high-grade malignant lymphoma in mice transgenic for the t(14; 18). *Nature* 1991;349:254-256.
63. Roulland S, Navarro JM, Grenot P et al. Follicular lymphoma-like B cells in healthy individuals: a novel intermediate step in early lymphomagenesis. *J.Exp.Med.* 2006;203:2425-2431.
64. Roulland S, Kelly RS, Morgado E et al. t(14;18) Translocation: A predictive blood biomarker for follicular lymphoma. *J.Clin.Oncol.* 2014;32:1347-1355.
65. Green MR, Gentles AJ, Nair RV et al. Hierarchy in somatic mutations arising during genomic evolution and progression of follicular lymphoma. *Blood* 2013;121:1604-1611.

66. Green MR, Kihira S, Liu CL et al. Mutations in early follicular lymphoma progenitors are associated with suppressed antigen presentation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2015;112:E1116-E1125.
67. Kahl BS, Yang DT. Follicular lymphoma: evolving therapeutic strategies. *Blood* 2016;127:2055-2063.
68. Kridel R, Sehn LH, Gascoyne RD. Pathogenesis of follicular lymphoma. *J.Clin.Invest* 2012;122:3424-3431.
69. Vang R, Medeiros LJ, Ha CS, Deavers M. Non-Hodgkin's lymphomas involving the uterus: a clinicopathologic analysis of 26 cases. *Mod.Pathol.* 2000;13:19-28.
70. Ferry JA, Fung CY, Zukerberg L et al. Lymphoma of the ocular adnexa: A study of 353 cases. *Am.J.Surg.Pathol.* 2007;31:170-184.
71. Ozsan N, Bedke BJ, Law ME et al. Clinicopathologic and genetic characterization of follicular lymphomas presenting in the ovary reveals 2 distinct subgroups. *Am.J.Surg.Pathol.* 2011;35:1691-1699.
72. Takata K, Miyata-Takata T, Sato Y et al. Gastrointestinal follicular lymphoma: Current knowledge and future challenges. *Pathol.Int.* 2018;68:1-6.
73. Smith A, Crouch S, Lax S et al. Lymphoma incidence, survival and prevalence 2004-2014: sub-type analyses from the UK's Haematological Malignancy Research Network. *Br.J.Cancer* 2015;112:1575-1584.
74. Muller AM, Ihorst G, Mertelsmann R, Engelhardt M. Epidemiology of non-Hodgkin's lymphoma (NHL): trends, geographic distribution, and etiology. *Ann.Hematol.* 2005;84:1-12.
75. Dreyling M, Ghielmini M, Rule S et al. Newly diagnosed and relapsed follicular lymphoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann.Oncol.* 2016;27:v83-v90.
76. Fritschi L, Benke G, Hughes AM et al. Occupational exposure to pesticides and risk of non-Hodgkin's lymphoma. *Am.J.Epidemiol.* 2005;162:849-857.
77. Agopian J, Navarro JM, Gac AC et al. Agricultural pesticide exposure and the molecular connection to lymphomagenesis. *J.Exp.Med.* 2009;206:1473-1483.
78. Conde L, Halperin E, Akers NK et al. Genome-wide association study of follicular lymphoma identifies a risk locus at 6p21.32. *Nat.Genet.* 2010;42:661-664.
79. Skibola CF, Berndt SI, Vijai J et al. Genome-wide association study identifies five susceptibility loci for follicular lymphoma outside the HLA region. *Am.J.Hum.Genet.* 2014;95:462-471.
80. Linet MS, Vajdic CM, Morton LM et al. Medical history, lifestyle, family history, and occupational risk factors for follicular lymphoma: the InterLymph Non-Hodgkin Lymphoma Subtypes Project. *J.Natl.Cancer Inst.Monogr* 2014;2014:26-40.
81. Ott G, Katzenberger T, Lohr A et al. Cytomorphologic, immunohistochemical, and cytogenetic profiles of follicular lymphoma: 2 types of follicular lymphoma grade 3. *Blood* 2002;99:3806-3812.
82. Salaverria I, Siebert R. Follicular lymphoma grade 3B. *Best.Pract.Res.Clin.Haematol.* 2011;24:111-119.
83. Horn H, Schmelter C, Leich E et al. Follicular lymphoma grade 3B is a distinct neoplasm according to cytogenetic and immunohistochemical profiles. *Haematologica* 2011;96:1327-1334.
84. Wahlin BE, Yri OE, Kimby E et al. Clinical significance of the WHO grades of follicular lymphoma in a population-based cohort of 505 patients with long follow-up times. *Br.J.Haematol.* 2012;156:225-233.
85. Cheson BD, Fisher RI, Barrington SF et al. Recommendations for initial evaluation, staging, and response assessment of Hodgkin and non-Hodgkin lymphoma: the Lugano classification. *J.Clin.Oncol.* 2014;32:3059-3068.
86. Rosenberg SA. Validity of the Ann Arbor staging classification for the non-Hodgkin's lymphomas. *Cancer Treat.Rep.* 1977;61:1023-1027.

87. Leonard JP, Nastoupil LJ, Flowers CR. Where to start? Upfront therapy for follicular lymphoma in 2018. *Hematology.Am.Soc.Hematol.Educ.Program.* 2018;2018:185-188.
88. Hiddemann W, Cheson BD. How we manage follicular lymphoma. *Leukemia* 2014;28:1388-1395.
89. Gribben JG. How I treat indolent lymphoma. *Blood* 2007;109:4617-4626.
90. Wilder RB, Jones D, Tucker SL et al. Long-term results with radiotherapy for Stage I-II follicular lymphomas. *Int.J.Radiat.Oncol.Biol.Phys.* 2001;51:1219-1227.
91. Ardeschna KM, Smith P, Norton A et al. Long-term effect of a watch and wait policy versus immediate systemic treatment for asymptomatic advanced-stage non-Hodgkin lymphoma: a randomised controlled trial. *Lancet* 2003;362:516-522.
92. Ardeschna KM, Qian W, Smith P et al. Rituximab versus a watch-and-wait approach in patients with advanced-stage, asymptomatic, non-bulky follicular lymphoma: an open-label randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2014;15:424-435.
93. Janikova A, Bortlicek Z, Campy V et al. Radiotherapy with rituximab may be better than radiotherapy alone in first-line treatment of early-stage follicular lymphoma: is it time to change the standard strategy? *Leuk.Lymphoma* 2015;56:2350-2356.
94. Sorigue M, Tuset V, Sancho JM. Treatment of localized-stage follicular lymphoma. *Eur.J.Haematol.* 2018
95. Salles G, Barrett M, Foa R et al. Rituximab in B-Cell Hematologic Malignancies: A Review of 20 Years of Clinical Experience. *Adv.Ther.* 2017;34:2232-2273.
96. Brice P, Bastion Y, Lepage E et al. Comparison in low-tumor-burden follicular lymphomas between an initial no-treatment policy, prednimustine, or interferon alfa: a randomized study from the Groupe d'Etude des Lymphomes Folliculaires. *Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte. J.Clin.Oncol.* 1997;15:1110-1117.
97. Solal-Celigny P, Lepage E, Brousse N et al. Doxorubicin-containing regimen with or without interferon alfa-2b for advanced follicular lymphomas: final analysis of survival and toxicity in the Groupe d'Etude des Lymphomes Folliculaires 86 Trial. *J.Clin.Oncol.* 1998;16:2332-2338.
98. Federico M, Luminari S, Dondi A et al. R-CVP versus R-CHOP versus R-FM for the initial treatment of patients with advanced-stage follicular lymphoma: results of the FOLL05 trial conducted by the Fondazione Italiana Linfomi. *J.Clin.Oncol.* 2013;31:1506-1513.
99. Hiddemann W, Kneba M, Dreyling M et al. Frontline therapy with rituximab added to the combination of cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone (CHOP) significantly improves the outcome for patients with advanced-stage follicular lymphoma compared with therapy with CHOP alone: results of a prospective randomized study of the German Low-Grade Lymphoma Study Group. *Blood* 2005;106:3725-3732.
100. Rummel MJ, Niederle N, Maschmeyer G et al. Bendamustine plus rituximab versus CHOP plus rituximab as first-line treatment for patients with indolent and mantle-cell lymphomas: an open-label, multicentre, randomised, phase 3 non-inferiority trial. *Lancet* 2013;381:1203-1210.
101. Morschhauser F, Fowler NH, Feugier P et al. Rituximab plus Lenalidomide in Advanced Untreated Follicular Lymphoma. *N.Engl.J.Med.* 2018;379:934-947.
102. Salles G, Seymour JF, Offner F et al. Rituximab maintenance for 2 years in patients with high tumour burden follicular lymphoma responding to rituximab plus chemotherapy (PRIMA): a phase 3, randomised controlled trial. *Lancet* 2011;377:42-51.
103. Sehn LH, Chua N, Mayer J et al. Obinutuzumab plus bendamustine versus bendamustine monotherapy in patients with rituximab-refractory indolent non-Hodgkin lymphoma (GADOLIN): a randomised, controlled, open-label, multicentre, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2016;17:1081-1093.
104. Flowers CR, Leonard JP, Nastoupil LJ. Novel immunotherapy approaches to follicular lymphoma. *Hematology.Am.Soc.Hematol.Educ.Program.* 2018;2018:194-199.

105. Smith SM, Godfrey J, Ahn KW et al. Autologous transplantation versus allogeneic transplantation in patients with follicular lymphoma experiencing early treatment failure. *Cancer* 2018;124:2541-2551.
106. Morschhauser F, Radford J, Van HA et al. 90Yttrium-ibritumomab tiuxetan consolidation of first remission in advanced-stage follicular non-Hodgkin lymphoma: updated results after a median follow-up of 7.3 years from the International, Randomized, Phase III First-Line Indolent trial. *J.Clin.Oncol.* 2013;31:1977-1983.
107. Flinn IW, van der JR, Kahl BS et al. Randomized trial of bendamustine-rituximab or R-CHOP/R-CVP in first-line treatment of indolent NHL or MCL: the BRIGHT study. *Blood* 2014;123:2944-2952.
108. Casulo C, Byrtek M, Dawson KL et al. Early Relapse of Follicular Lymphoma After Rituximab Plus Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine, and Prednisone Defines Patients at High Risk for Death: An Analysis From the National LymphoCare Study. *J.Clin.Oncol.* 2015;33:2516-2522.
109. Alonso-Alvarez S, Magnano L, Alcoceba M et al. Risk of, and survival following, histological transformation in follicular lymphoma in the rituximab era. A retrospective multicentre study by the Spanish GELTAMO group. *Br.J.Haematol.* 2017;178:699-708.
110. Alcoceba, M., Alonso-Alvarez, S., García-Álvarez, M, Martín, A, and Caballero, M. D. Unmet needs in histological transformation of follicular lymphoma: a clinical and biological review. *Ann.Lymphoma* 1. 21-11-2017.
111. Wagner-Johnston ND, Link BK, Byrtek M et al. Outcomes of transformed follicular lymphoma in the modern era: a report from the National LymphoCare Study (NLCS). *Blood* 2015;126:851-857.
112. Minoia C, Zucca E, Conconi A. Novel acquisitions on biology and management of transformed follicular lymphoma. *Hematol.Oncol.* 2018;36:617-623.
113. Solal-Celigny P, Roy P, Colombat P et al. Follicular lymphoma international prognostic index. *Blood* 2004;104:1258-1265.
114. Federico M, Bellei M, Marcheselli L et al. Follicular lymphoma international prognostic index 2: a new prognostic index for follicular lymphoma developed by the international follicular lymphoma prognostic factor project. *J.Clin.Oncol.* 2009;27:4555-4562.
115. Buske C, Hoster E, Dreyling M et al. The Follicular Lymphoma International Prognostic Index (FLIPI) separates high-risk from intermediate- or low-risk patients with advanced-stage follicular lymphoma treated front-line with rituximab and the combination of cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone (R-CHOP) with respect to treatment outcome. *Blood* 2006;108:1504-1508.
116. Nooka AK, Nabhan C, Zhou X et al. Examination of the follicular lymphoma international prognostic index (FLIPI) in the National LymphoCare study (NLCS): a prospective US patient cohort treated predominantly in community practices. *Ann.Oncol.* 2013;24:441-448.
117. Kahl BS. Follicular lymphoma: are we ready for a risk-adapted approach? *Hematology.Am.Soc.Hematol.Educ.Program.* 2017;2017:358-364.
118. Bachy E, Maurer MJ, Habermann TM et al. A simplified scoring system in de novo follicular lymphoma treated initially with immunochemotherapy. *Blood* 2018;132:49-58.
119. Pastore A, Jurinovic V, Kridel R et al. Integration of gene mutations in risk prognostication for patients receiving first-line immunochemotherapy for follicular lymphoma: a retrospective analysis of a prospective clinical trial and validation in a population-based registry. *Lancet Oncol.* 2015;16:1111-1122.
120. Jurinovic V, Kridel R, Staiger AM et al. Clinicogenetic risk models predict early progression of follicular lymphoma after first-line immunochemotherapy. *Blood* 2016;128:1112-1120.
121. Trotman J, Luminari S, Boussetta S et al. Prognostic value of PET-CT after first-line therapy in patients with follicular lymphoma: a pooled analysis of central scan review in three multicentre studies. *Lancet Haematol.* 2014;1:e17-e27.

122. Tychyj-Pinel C, Ricard F, Fulham M et al. PET/CT assessment in follicular lymphoma using standardized criteria: central review in the PRIMA study. *Eur.J.Nucl.Med.Mol.Imaging* 2014;41:408-415.
123. Shi Q, Flowers CR, Hiddemann W et al. Thirty-Month Complete Response as a Surrogate End Point in First-Line Follicular Lymphoma Therapy: An Individual Patient-Level Analysis of Multiple Randomized Trials. *J.Clin.Oncol.* 2016JCO2016708651.
124. Magnano L, Alonso-Alvarez S, Alcoceba M et al. Patients with follicular lymphoma (FL) in maintained complete response (CR) at 30 months show a survival similar to a sex- and age-matched spanish general population [abstract]. *Hematol.Oncol.* 2017;
125. Cleary ML, Meeker TC, Levy S et al. Clustering of extensive somatic mutations in the variable region of an immunoglobulin heavy chain gene from a human B cell lymphoma. *Cell* 1986;44:97-106.
126. Ottensmeier CH, Thompsett AR, Zhu D et al. Analysis of VH genes in follicular and diffuse lymphoma shows ongoing somatic mutation and multiple isotype transcripts in early disease with changes during disease progression. *Blood* 1998;91:4292-4299.
127. Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999;94:1848-1854.
128. Tobin G, Thunberg U, Johnson A et al. Somatic mutated Ig V(H)3-21 genes characterize a new subset of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002;99:2262-2264.
129. Baliakas P, Agathangelidis A, Hadzidimitriou A et al. Not all IGHV3-21 chronic lymphocytic leukemias are equal: prognostic considerations. *Blood* 2015;125:856-859.
130. Ghia EM, Jain S, Widhopf GF et al. Use of IGHV3-21 in chronic lymphocytic leukemia is associated with high-risk disease and reflects antigen-driven, post-germinal center leukemogenic selection. *Blood* 2008;111:5101-5108.
131. Sebastian E, Alcoceba M, Balanzategui A et al. Molecular characterization of immunoglobulin gene rearrangements in diffuse large B-cell lymphoma: antigen-driven origin and IGHV4-34 as a particular subgroup of the non-GCB subtype. *Am.J.Pathol.* 2012;181:1879-1888.
132. Brisou G, Verney A, Wenner T et al. A restricted IGHV gene repertoire in splenic marginal zone lymphoma is associated with autoimmune disorders. *Haematologica* 2014;99:e197-e198.
133. Martin-Jimenez P, Garcia-Sanz R, Balanzategui A et al. Molecular characterization of heavy chain immunoglobulin gene rearrangements in Waldenstrom's macroglobulinemia and IgM monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Haematologica* 2007;92:635-642.
134. Camacho FI, Algara P, Rodriguez A et al. Molecular heterogeneity in MCL defined by the use of specific VH genes and the frequency of somatic mutations. *Blood* 2003;101:4042-4046.
135. Bahler DW, Campbell MJ, Hart S et al. Ig VH gene expression among human follicular lymphomas. *Blood* 1991;78:1561-1568.
136. Noppe SM, Heirman C, Bakkus MH et al. The genetic variability of the VH genes in follicular lymphoma: the impact of the hypermutation mechanism. *Br.J.Haematol.* 1999;107:625-640.
137. Hsu FJ, Levy R. Preferential use of the VH4 Ig gene family by diffuse large-cell lymphoma. *Blood* 1995;86:3072-3082.
138. Aarts WM, Bende RJ, Steenbergen EJ et al. Variable heavy chain gene analysis of follicular lymphomas: correlation between heavy chain isotype expression and somatic mutation load. *Blood* 2000;95:2922-2929.
139. Catherwood MA, Gonzalez D, Patton C et al. Improved clonality assessment in germinal centre/post-germinal centre non-Hodgkin's lymphomas with high rates of somatic hypermutation. *J.Clin.Pathol.* 2007;60:524-528.
140. Berget E, Molven A, Lokeland T, Helgeland L, Vintermyr OK. IGHV gene usage and mutational status in follicular lymphoma: Correlations with prognosis and patient age. *Leuk.Res.* 2015;39:702-708.
141. Damle RN, Wasil T, Fais F et al. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999;94:1840-1847.

142. Cheung KJ, Shah SP, Steidl C et al. Genome-wide profiling of follicular lymphoma by array comparative genomic hybridization reveals prognostically significant DNA copy number imbalances. *Blood* 2009;113:137-148.
143. Schwaenen C, Viardot A, Berger H et al. Microarray-based genomic profiling reveals novel genomic aberrations in follicular lymphoma which associate with patient survival and gene expression status. *Genes Chromosomes.Cancer* 2009;48:39-54.
144. Oricchio E, Nanjangud G, Wolfe AL et al. The Eph-receptor A7 is a soluble tumor suppressor for follicular lymphoma. *Cell* 2011;147:554-564.
145. Horsman DE, Connors JM, Pantzar T, Gascoyne RD. Analysis of secondary chromosomal alterations in 165 cases of follicular lymphoma with t(14;18). *Genes Chromosomes.Cancer* 2001;30:375-382.
146. Hoglund M, Sehn L, Connors JM et al. Identification of cytogenetic subgroups and karyotypic pathways of clonal evolution in follicular lymphomas. *Genes Chromosomes.Cancer* 2004;39:195-204.
147. Bouska A, McKeithan TW, Deffenbacher KE et al. Genome-wide copy-number analyses reveal genomic abnormalities involved in transformation of follicular lymphoma. *Blood* 2014;123:1681-1690.
148. de JD. Molecular pathogenesis of follicular lymphoma: a cross talk of genetic and immunologic factors. *J.Clin.Oncol.* 2005;23:6358-6363.
149. Tilly H, Rossi A, Stamatoullas A et al. Prognostic value of chromosomal abnormalities in follicular lymphoma. *Blood* 1994;84:1043-1049.
150. Cheung KJ, Delaney A, Ben-Neriah S et al. High resolution analysis of follicular lymphoma genomes reveals somatic recurrent sites of copy-neutral loss of heterozygosity and copy number alterations that target single genes. *Genes Chromosomes.Cancer* 2010;49:669-681.
151. O'Shea D, O'Riain C, Gupta M et al. Regions of acquired uniparental disomy at diagnosis of follicular lymphoma are associated with both overall survival and risk of transformation. *Blood* 2009;113:2298-2301.
152. Qu X, Li H, Braziel RM et al. Genomic alterations important for the prognosis in patients with follicular lymphoma treated on SWOG study S0016. *Blood* 2018
153. Kupperts R, Stevenson FK. Critical influences on the pathogenesis of follicular lymphoma. *Blood* 2018;131:2297-2306.
154. Huet S, Sujobert P, Salles G. From genetics to the clinic: a translational perspective on follicular lymphoma. *Nat.Rev.Cancer* 2018;18:224-239.
155. Morin RD, Mendez-Lago M, Mungall AJ et al. Frequent mutation of histone-modifying genes in non-Hodgkin lymphoma. *Nature* 2011;476:298-303.
156. Okosun J, Bodor C, Wang J et al. Integrated genomic analysis identifies recurrent mutations and evolution patterns driving the initiation and progression of follicular lymphoma. *Nat.Genet.* 2014;46:176-181.
157. Zhang J, Dominguez-Sola D, Hussein S et al. Disruption of KMT2D perturbs germinal center B cell development and promotes lymphomagenesis. *Nat.Med.* 2015;21:1190-1198.
158. Morin RD, Johnson NA, Severson TM et al. Somatic mutations altering EZH2 (Tyr641) in follicular and diffuse large B-cell lymphomas of germinal-center origin. *Nat.Genet.* 2010;42:181-185.
159. Sneeringer CJ, Scott MP, Kuntz KW et al. Coordinated activities of wild-type plus mutant EZH2 drive tumor-associated hypertrimethylation of lysine 27 on histone H3 (H3K27) in human B-cell lymphomas. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2010;107:20980-20985.
160. Yap DB, Chu J, Berg T et al. Somatic mutations at EZH2 Y641 act dominantly through a mechanism of selectively altered PRC2 catalytic activity, to increase H3K27 trimethylation. *Blood* 2011;117:2451-2459.

161. Pasqualucci L, Dominguez-Sola D, Chiarenza A et al. Inactivating mutations of acetyltransferase genes in B-cell lymphoma. *Nature* 2011;471:189-195.
162. Li H, Kaminski MS, Li Y et al. Mutations in linker histone genes HIST1H1 B, C, D, and E; OCT2 (POU2F2); IRF8; and ARID1A underlying the pathogenesis of follicular lymphoma. *Blood* 2014;123:1487-1498.
163. Cheung KJ, Johnson NA, Affleck JG et al. Acquired TNFRSF14 mutations in follicular lymphoma are associated with worse prognosis. *Cancer Res.* 2010;70:9166-9174.
164. Launay E, Pangault C, Bertrand P et al. High rate of TNFRSF14 gene alterations related to 1p36 region in de novo follicular lymphoma and impact on prognosis. *Leukemia* 2012;26:559-562.
165. Cai G, Freeman GJ. The CD160, BTLA, LIGHT/HVEM pathway: a bidirectional switch regulating T-cell activation. *Immunol.Rev.* 2009;229:244-258.
166. Steinberg MW, Cheung TC, Ware CF. The signaling networks of the herpesvirus entry mediator (TNFRSF14) in immune regulation. *Immunol.Rev.* 2011;244:169-187.
167. Boice M, Salloum D, Mourcin F et al. Loss of the HVEM Tumor Suppressor in Lymphoma and Restoration by Modified CAR-T Cells. *Cell* 2016;167:405-418.
168. Yildiz M, Li H, Bernard D et al. Activating STAT6 mutations in follicular lymphoma. *Blood* 2015;125:668-679.
169. Krysiak K, Gomez F, White BS et al. Recurrent somatic mutations affecting B-cell receptor signaling pathway genes in follicular lymphoma. *Blood* 2017;129:473-483.
170. Huet S, Szafer-Glusman E, Tesson B et al. BCL2 mutations do not confer adverse prognosis in follicular lymphoma patients treated with rituximab. *Am.J.Hematol.* 2017;92:515-519.
171. O'Shea D, O'Riain C, Taylor C et al. The presence of TP53 mutation at diagnosis of follicular lymphoma identifies a high-risk group of patients with shortened time to disease progression and poorer overall survival. *Blood* 2008;112:3126-3129.
172. van den BM, Scheijen B, Hess CJ, van Krieken JHJ, Groenen PJTA. Pathways towards indolent B-cell lymphoma - Etiology and therapeutic strategies. *Blood Rev.* 2017;31:426-435.
173. Pon JR, Wong J, Saberi S et al. MEF2B mutations in non-Hodgkin lymphoma dysregulate cell migration by decreasing MEF2B target gene activation. *Nat.Commun.* 2015;6:7953.
174. Korfi K, Ali S, Heward JA, Fitzgibbon J. Follicular lymphoma, a B cell malignancy addicted to epigenetic mutations. *Epigenetics.* 2017;12:370-377.
175. Dominguez-Sola D, Kung J, Holmes AB et al. The FOXO1 Transcription Factor Instructs the Germinal Center Dark Zone Program. *Immunity.* 2015;43:1064-1074.
176. Sander S, Chu VT, Yasuda T et al. PI3 Kinase and FOXO1 Transcription Factor Activity Differentially Control B Cells in the Germinal Center Light and Dark Zones. *Immunity.* 2015;43:1075-1086.
177. Hagman J, Belanger C, Travis A, Turck CW, Grosschedl R. Cloning and functional characterization of early B-cell factor, a regulator of lymphocyte-specific gene expression. *Genes Dev.* 1993;7:760-773.
178. Treiber N, Treiber T, Zocher G, Grosschedl R. Structure of an Ebf1:DNA complex reveals unusual DNA recognition and structural homology with Rel proteins. *Genes Dev.* 2010;24:2270-2275.
179. Loeffler M, Kreuz M, Haake A et al. Genomic and epigenomic co-evolution in follicular lymphomas. *Leukemia* 2015;29:456-463.
180. Carlotti E, Wrench D, Matthews J et al. Transformation of follicular lymphoma to diffuse large B-cell lymphoma may occur by divergent evolution from a common progenitor cell or by direct evolution from the follicular lymphoma clone. *Blood* 2009;113:3553-3557.

181. Ruminy P, Jardin F, Picquenot JM et al. S(mu) mutation patterns suggest different progression pathways in follicular lymphoma: early direct or late from FL progenitor cells. *Blood* 2008;112:1951-1959.
182. Pasqualucci L, Khababian H, Fangazio M et al. Genetics of follicular lymphoma transformation. *Cell Rep.* 2014;6:130-140.
183. Kridel R, Chan FC, Mottok A et al. Histological Transformation and Progression in Follicular Lymphoma: A Clonal Evolution Study. *PLoS.Med.* 2016;13:e1002197.
184. Eide MB, Liestol K, Lingjaerde OC et al. Genomic alterations reveal potential for higher grade transformation in follicular lymphoma and confirm parallel evolution of tumor cell clones. *Blood* 2010;116:1489-1497.
185. Lossos IS, Gascoyne RD. Transformation of follicular lymphoma. *Best.Pract.Res.Clin.Haematol.* 2011;24:147-163.
186. Montoto S, Fitzgibbon J. Transformation of indolent B-cell lymphomas. *J.Clin.Oncol.* 2011;29:1827-1834.
187. Wartenberg M, Vasil P, zum Bueschenfelde CM et al. Somatic hypermutation analysis in follicular lymphoma provides evidence suggesting bidirectional cell migration between lymph node and bone marrow during disease progression and relapse. *Haematologica* 2013;98:1433-1441.
188. Araf S, Wang J, Korfi K et al. Genomic profiling reveals spatial intra-tumor heterogeneity in follicular lymphoma. *Leukemia* 2018;32:1258-1263.
189. Kridel R, Sehn LH, Gascoyne RD. Can histologic transformation of follicular lymphoma be predicted and prevented? *Blood* 2017;130:258-266.
190. Rossi D, Cerri M, Capello D et al. Biological and clinical risk factors of chronic lymphocytic leukaemia transformation to Richter syndrome. *Br.J.Haematol.* 2008;142:202-215.
191. Rossi D, Spina V, Gaidano G. Biology and treatment of Richter syndrome. *Blood* 2018;131:2761-2772.
192. Wasik-Szczepanek E, Szymczyk A, Szczepanek D et al. Richter syndrome: A rare complication of chronic lymphocytic leukemia or small lymphocytic lymphoma. *Adv.Clin.Exp.Med.* 2018
193. Camacho FI, Mollejo M, Mateo MS et al. Progression to large B-cell lymphoma in splenic marginal zone lymphoma: a description of a series of 12 cases. *Am.J.Surg.Pathol.* 2001;25:1268-1276.
194. Casulo C, Friedberg J. Transformation of marginal zone lymphoma (and association with other lymphomas). *Best.Pract.Res.Clin.Haematol.* 2017;30:131-138.
195. Jimenez C, onso-Alvarez S, Alcoceba M et al. From Waldenstrom's macroglobulinemia to aggressive diffuse large B-cell lymphoma: a whole-exome analysis of abnormalities leading to transformation. *Blood Cancer J.* 2017;7:e591.
196. Al-Mansour M, Connors JM, Gascoyne RD, Skinnider B, Savage KJ. Transformation to aggressive lymphoma in nodular lymphocyte-predominant Hodgkin's lymphoma. *J.Clin.Oncol.* 2010;28:793-799.
197. Casulo C, Burack WR, Friedberg JW. Transformed follicular non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 2015;125:40-47.
198. Salles G, Coiffier B. Histologic transformation in follicular lymphoma. *Ann.Oncol.* 1998;9:803-805.
199. Gine E, Montoto S, Bosch F et al. The Follicular Lymphoma International Prognostic Index (FLIPI) and the histological subtype are the most important factors to predict histological transformation in follicular lymphoma. *Ann.Oncol.* 2006;17:1539-1545.
200. Wang SA, Wang L, Hochberg EP et al. Low histologic grade follicular lymphoma with high proliferation index: morphologic and clinical features. *Am.J.Surg.Pathol.* 2005;29:1490-1496.
201. Bastion Y, Sebban C, Berger F et al. Incidence, predictive factors, and outcome of lymphoma transformation in follicular lymphoma patients. *J.Clin.Oncol.* 1997;15:1587-1594.
202. Al-Tourah AJ, Gill KK, Chhanabhai M et al. Population-based analysis of incidence and outcome of transformed non-Hodgkin's lymphoma. *J.Clin.Oncol.* 2008;26:5165-5169.

203. Link BK, Maurer MJ, Nowakowski GS et al. Rates and outcomes of follicular lymphoma transformation in the immunochemotherapy era: a report from the University of Iowa/MayoClinic Specialized Program of Research Excellence Molecular Epidemiology Resource. *J.Clin.Oncol.* 2013;31:3272-3278.
204. Schoder H, Noy A, Gonen M et al. Intensity of 18fluorodeoxyglucose uptake in positron emission tomography distinguishes between indolent and aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *J.Clin.Oncol.* 2005;23:4643-4651.
205. Bodet-Milin C, Kraeber-Bodere F, Moreau P et al. Investigation of FDG-PET/CT imaging to guide biopsies in the detection of histological transformation of indolent lymphoma. *Haematologica* 2008;93:471-472.
206. Noy A, Schoder H, Gonen M et al. The majority of transformed lymphomas have high standardized uptake values (SUVs) on positron emission tomography (PET) scanning similar to diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL). *Ann.Oncol.* 2009;20:508-512.
207. Ngeow JY, Quek RH, Ng DC et al. High SUV uptake on FDG-PET/CT predicts for an aggressive B-cell lymphoma in a prospective study of primary FDG-PET/CT staging in lymphoma. *Ann.Oncol.* 2009;20:1543-1547.
208. Montoto S, Davies AJ, Matthews J et al. Risk and clinical implications of transformation of follicular lymphoma to diffuse large B-cell lymphoma. *J.Clin.Oncol.* 2007;25:2426-2433.
209. Bains P, Al TA, Campbell BA et al. Incidence of transformation to aggressive lymphoma in limited-stage follicular lymphoma treated with radiotherapy. *Ann.Oncol.* 2013;24:428-432.
210. Sarkozy C, Trneny M, Xerri L et al. Risk Factors and Outcomes for Patients With Follicular Lymphoma Who Had Histologic Transformation After Response to First-Line Immunochemotherapy in the PRIMA Trial. *J.Clin.Oncol.* 2016;34:2575-2582.
211. Davies AJ, Rosenwald A, Wright G et al. Transformation of follicular lymphoma to diffuse large B-cell lymphoma proceeds by distinct oncogenic mechanisms. *Br.J.Haematol.* 2007;136:286-293.
212. Kridel R, Mottok A, Farinha P et al. Cell of origin of transformed follicular lymphoma. *Blood* 2015;126:2118-2127.
213. Okosun J, Montoto S, Fitzgibbon J. The routes for transformation of follicular lymphoma. *Curr.Opin.Hematol.* 2016;23:385-391.
214. Lo CF, Gaidano G, Louie DC et al. p53 mutations are associated with histologic transformation of follicular lymphoma. *Blood* 1993;82:2289-2295.
215. Yano T, Jaffe ES, Longo DL, Raffeld M. MYC rearrangements in histologically progressed follicular lymphomas. *Blood* 1992;80:758-767.
216. Alhejaily A, Day AG, Feilotter HE, Baetz T, Lebrun DP. Inactivation of the CDKN2A tumor-suppressor gene by deletion or methylation is common at diagnosis in follicular lymphoma and associated with poor clinical outcome. *Clin.Cancer Res.* 2014;20:1676-1686.
217. Bouska A, Zhang W, Gong Q et al. Combined copy number and mutation analysis identifies oncogenic pathways associated with transformation of follicular lymphoma. *Leukemia* 2017;31:83-91.
218. Godfrey J, Leukam MJ, Smith SM. An update in treating transformed lymphoma. *Best.Pract.Res.Clin.Haematol.* 2018;31:251-261.
219. Federico M, Caballero B, Marcheselli L et al. Rituximab and the risk of transformation of follicular lymphoma: a retrospective pooled analysis. *Lancet Haematol.* 2018;5:e359-e367.
220. Mozesso L, Cheung MC, Crump M et al. Chemoimmunotherapy resistant follicular lymphoma: predictors of resistance, association with transformation and prognosis. *Leuk.Lymphoma* 2014;55:2502-2507.
221. Conconi A, Ponzio C, Lobetti-Bodoni C et al. Incidence, risk factors and outcome of histological transformation in follicular lymphoma. *Br.J.Haematol.* 2012;157:188-196.
222. Rabbitts TH. Chromosomal translocations in human cancer. *Nature* 1994;372:143-149.
223. Akasaka T, Lossos IS, Levy R. BCL6 gene translocation in follicular lymphoma: a harbinger of eventual transformation to diffuse aggressive lymphoma. *Blood* 2003;102:1443-1448.

224. Ohno H, Fukuhara S. Significance of rearrangement of the BCL6 gene in B-cell lymphoid neoplasms. *Leuk.Lymphoma* 1997;27:53-63.
225. Chen W, Iida S, Louie DC, la-Favera R, Chaganti RS. Heterologous promoters fused to BCL6 by chromosomal translocations affecting band 3q27 cause its deregulated expression during B-cell differentiation. *Blood* 1998;91:603-607.
226. Lossos IS, Levy R. Higher-grade transformation of follicle center lymphoma is associated with somatic mutation of the 5' noncoding regulatory region of the BCL-6 gene. *Blood* 2000;96:635-639.
227. Lossos IS, Warnke R, Levy R. BCL-6 mRNA expression in higher grade transformation of follicle center lymphoma: correlation with somatic mutations in the 5' regulatory region of the BCL-6 gene. *Leukemia* 2002;16:1857-1862.
228. Pasqualucci L, Migliazza A, Basso K et al. Mutations of the BCL6 proto-oncogene disrupt its negative autoregulation in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2003;101:2914-2923.
229. Fitzgibbon J, Iqbal S, Davies A et al. Genome-wide detection of recurring sites of uniparental disomy in follicular and transformed follicular lymphoma. *Leukemia* 2007;21:1514-1520.
230. Rossi D, Berra E, Cerri M et al. Aberrant somatic hypermutation in transformation of follicular lymphoma and chronic lymphocytic leukemia to diffuse large B-cell lymphoma. *Haematologica* 2006;91:1405-1409.
231. Matolcsy A, Casali P, Warnke RA, Knowles DM. Morphologic transformation of follicular lymphoma is associated with somatic mutation of the translocated Bcl-2 gene. *Blood* 1996;88:3937-3944.
232. Correia C, Schneider PA, Dai H et al. BCL2 mutations are associated with increased risk of transformation and shortened survival in follicular lymphoma. *Blood* 2015;125:658-667.
233. Do B, Lossos IS, Thorstenson Y, Oefner PJ, Levy R. Analysis of FAS (CD95) gene mutations in higher-grade transformation of follicle center lymphoma. *Leuk.Lymphoma* 2003;44:1317-1323.
234. Glas AM, Knoops L, Delahaye L et al. Gene-expression and immunohistochemical study of specific T-cell subsets and accessory cell types in the transformation and prognosis of follicular lymphoma. *J.Clin.Oncol.* 2007;25:390-398.
235. Carreras J, Lopez-Guillermo A, Roncador G et al. High numbers of tumor-infiltrating programmed cell death 1-positive regulatory lymphocytes are associated with improved overall survival in follicular lymphoma. *J.Clin.Oncol.* 2009;27:1470-1476.
236. Carreras J, Lopez-Guillermo A, Fox BC et al. High numbers of tumor-infiltrating FOXP3-positive regulatory T cells are associated with improved overall survival in follicular lymphoma. *Blood* 2006;108:2957-2964.
237. Farinha P, Al-Tourah A, Gill K et al. The architectural pattern of FOXP3-positive T cells in follicular lymphoma is an independent predictor of survival and histologic transformation. *Blood* 2010;115:289-295.
238. Farinha P, Kyle AH, Minchinton AI et al. Vascularization predicts overall survival and risk of transformation in follicular lymphoma. *Haematologica* 2010;95:2157-2160.
239. Fu K, Weisenburger DD, Choi WW et al. Addition of rituximab to standard chemotherapy improves the survival of both the germinal center B-cell-like and non-germinal center B-cell-like subtypes of diffuse large B-cell lymphoma. *J.Clin.Oncol.* 2008;26:4587-4594.
240. Pfreundschuh M, Kuhnt E, Trumper L et al. CHOP-like chemotherapy with or without rituximab in young patients with good-prognosis diffuse large-B-cell lymphoma: 6-year results of an open-label randomised study of the MabThera International Trial (MInT) Group. *Lancet Oncol.* 2011;12:1013-1022.
241. Ban-Hoefen M, Vanderplas A, Crosby-Thompson AL et al. Transformed non-Hodgkin lymphoma in the rituximab era: analysis of the NCCN outcomes database. *Br.J.Haematol.* 2013;163:487-495.
242. Montoto S. Treatment of patients with transformed lymphoma. *Hematology.Am.Soc.Hematol.Educ.Program.* 2015;2015:625-630.

243. Gleeson M, Hawkes EA, Peckitt C et al. Outcomes for transformed follicular lymphoma in the rituximab era: the Royal Marsden experience 2003-2013. *Leuk.Lymphoma* 2017;58:1805-1813.
244. Kuruville J, MacDonald DA, Kouroukis CT et al. Salvage chemotherapy and autologous stem cell transplantation for transformed indolent lymphoma: a subset analysis of NCIC CTG LY12. *Blood* 2015;126:733-738.
245. Madsen C, Pedersen MB, Vase MO et al. Outcome determinants for transformed indolent lymphomas treated with or without autologous stem-cell transplantation. *Ann.Oncol.* 2015;26:393-399.
246. Hamadani M, Awan FT, Elder P et al. Feasibility of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for follicular lymphoma undergoing transformation to diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk.Lymphoma* 2008;49:1893-1898.
247. Thomson KJ, Morris EC, Bloor A et al. Favorable long-term survival after reduced-intensity allogeneic transplantation for multiple-relapse aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *J.Clin.Oncol.* 2009;27:426-432.
248. Clavert A, Le GS, Brissot E et al. Reduced-intensity conditioning allogeneic stem cell transplant for relapsed or transformed aggressive B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Leuk.Lymphoma* 2010;51:1502-1508.
249. Villa D, Crump M, Panzarella T et al. Autologous and allogeneic stem-cell transplantation for transformed follicular lymphoma: a report of the Canadian blood and marrow transplant group. *J.Clin.Oncol.* 2013;31:1164-1171.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

El linfoma folicular (LF) es una enfermedad muy heterogénea desde el punto de vista clínico y genético. A pesar de su curso indolente, hasta un 20% de los pacientes con LF no responden al tratamiento de primera línea o no alcanzan remisión completa tras la inducción y el mantenimiento. Además, cada año un 2-3% de los pacientes sufre una transformación histológica (TH) a un linfoma de carácter agresivo, evento que sigue siendo uno de los peores del curso clínico del LF. A pesar de ser el linfoma indolente más frecuente, el conocimiento de los mecanismos de linfomagénesis y transformación aún es limitado, sin que existan marcadores o índices que permitan la predicción de recaídas, resistencias a las terapias convencionales o TH a un linfoma de histología agresiva de forma precisa.

Como es bien sabido, el LF es una neoplasia de célula B madura que tiene su origen en la transformación maligna de células B como consecuencia de un bloqueo en su capacidad de diferenciación. Por tanto, parece lógico pensar que la ontogenia y fisiología de la célula B podrían mostrar un papel importante en el desarrollo de estas neoplasias. Además, conocer los mecanismos moleculares que acontecen en la médula ósea podría permitir la identificación de características diferenciales en el desarrollo de esta patología que ayudarían a identificar aquellos pacientes que van a presentar un peor pronóstico, incluyendo aquellos susceptibles de sufrir TH. En este contexto, el estudio del repertorio de los genes de las inmunoglobulinas, como parte de la biología de esta enfermedad, ha sido escasamente analizado e inexplorado en la TH a linfoma agresivo.

Por otro lado, el pronóstico desfavorable manifestado por una proporción importante de pacientes con LF podría depender de las características genéticas del tumor, que cooperarían entre sí y con el microambiente. En este ámbito, aunque se conoce el perfil genético del LF, se desconoce el impacto clínico de la mayoría de las alteraciones genéticas descritas como frecuentes en LF y su contrapartida transformada. Dado que algunos de los genes implicados forman parte de una misma categoría funcional, es de prever que las mutaciones en cualquiera de ellos provoquen una alteración de la función celular afectada, bien con ganancia o bien con pérdida de función, alterando la biología de la célula tumoral y en consecuencia el pronóstico de los pacientes. Además, dado que existen inhibidores de algunas moléculas implicadas en estas mutaciones (*BCL6*, *EZH2*), su estudio sería de utilidad en el tratamiento individualizado de esta patología o en la identificación de potenciales dianas terapéuticas.

Todo lo descrito lleva a pensar que el desarrollo de estudios a gran escala que analicen el perfil de alteraciones genómicas de la célula tumoral conjuntamente con los factores clínicos involucrados, permitirían identificar biomarcadores para predecir qué pacientes tendrán una peor respuesta y cuáles sufrirán TH y, por tanto, requerirán terapias más intensivas que los demás. Los resultados obtenidos recientemente al desarrollar el modelo de riesgo clínico-genético m7-FLIPI, pese a sus limitaciones, resaltan la relevancia de estos estudios integrados que analizan conjuntamente factores clínicos y biológicos.

Por otra parte, el estudio de estas alteraciones genéticas en biopsias secuenciales representativas de cada episodio de la evolución del LF con TH definiría el papel de las alteraciones más frecuentes en cada momento, permitiendo establecer un patrón de evolución del clon tumoral que ayude a esclarecer la biología y patogénesis del proceso de transformación.

En resumen, el estudio biológico que se plantea permitirá identificar las alteraciones moleculares asociadas a fracaso terapéutico, respuesta a los 30 meses desde la inducción, transformación y mortalidad, que contribuyan a diseñar ensayos clínicos prospectivos con una estrategia diferente para pacientes de alto riesgo, ya sea con quimioterápicos convencionales o con nuevas moléculas activas contra las vías de señalización afectadas.

En este contexto, la presente tesis doctoral pretende confirmar las siguientes hipótesis:

- I. El estudio de la fisiología y ontogenia de la célula B en el ámbito del reordenamiento de los genes V(D)J y el proceso de hipermutación somática (HMS) permitirá diferenciar el LF de otras neoplasias de célula B madura y analizar si el uso de un determinado gen IGHV y la tasa de HMS identifica pacientes con pronóstico desfavorable, en especial, aquellos susceptibles de TH. Su aplicabilidad en la mayoría de pacientes y la facilidad de uso lo convertirían en un excelente biomarcador.
- II. Las anomalías genéticas del clon tumoral y su complejidad podrían explicar la heterogeneidad del LF, y su estudio permitirá detectar biomarcadores en el momento del diagnóstico que definan pacientes con comportamiento agresivo y, por tanto, con peor pronóstico.
- III. Conocer las alteraciones en cada uno de los episodios clínicos manifestados durante el curso del LF que experimenta TH permitirá detectar factores biológicos diferenciales y responsables de cada uno de ellos, así como establecer un patrón o modelo de evolución que refleje y ayude a comprender los distintos escenarios de la enfermedad.

OBJETIVOS

Mediante el presente trabajo doctoral, pretendemos mejorar nuestro conocimiento acerca del linfoma folicular, y con esta premisa, nos planteamos los siguientes objetivos:

I) PRIMER TRABAJO: ESTUDIO DEL REORDENAMIENTO DE LOS GENES DE LA CADENA PESADA DE LAS INMUNOGLOBULINAS EN EL LINFOMA FOLICULAR Y SU PAPEL EN LA TRANSFORMACIÓN HISTOLÓGICA A LINFOMA AGRESIVO.

- Análisis del reordenamiento completo de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (Igs) para profundizar en el conocimiento de la biología del linfoma folicular (LF) desde etapas iniciales de su desarrollo.
 - Estudiar el uso de segmentos génicos de los genes de la cadena pesada de las Igs involucrados en el reordenamiento V(D)J en el LF.
 - Analizar la tasa de hipermutación somática (HMS) en la serie de pacientes con LF.
 - Identificar el uso de los genes IGHV en muestras pareadas de LF en el momento del diagnóstico y de la transformación histológica (TH) como confirmación de clonalidad para discriminar TH vs. LDCBG secundarios no clonalmente relacionados.
 - Realizar un análisis comparativo de los genes IGHV, en primer lugar, entre las distintas neoplasias de célula B madura y, en segundo lugar, entre el LF con TH, el LF sin TH y el linfoma difuso de célula B grande (LDCBG) *de novo*, para determinar características diferenciales tanto del LF como de la TH, respectivamente.
 - Análisis de la implicación clínica y pronóstica de los genes IGHV y la frecuencia de HMS en la serie de pacientes con LF, así como de su posible papel en el riesgo de TH.

II) SEGUNDO TRABAJO: CARACTERIZACIÓN GENÓMICA DE PACIENTES CON LINFOMA FOLICULAR. IDENTIFICACIÓN DE ALTERACIONES GÉNICAS ASOCIADAS CON LA EVOLUCIÓN CLÍNICA Y APLICACIÓN DEL m7-FLIPI EN NUESTRA SERIE.

- Comprender los mecanismos responsables de la heterogeneidad característica del LF y correlacionarlos con el comportamiento clínico de la enfermedad en pacientes con condiciones terapéuticas homogéneas.
 - Estudiar el perfil mutacional en el momento del diagnóstico de todos los pacientes con LF, mediante un panel dirigido de secuenciación de nueva generación, así como las categorías funcionales más recurrentemente afectadas en esta enfermedad.

- Desentrañar la patogénesis del LF desde su diagnóstico e investigar qué genes y/o categorías funcionales podrían condicionar la evolución y pronóstico de dicha enfermedad.
- Analizar la complejidad genética, en base al número de genes alterados y número de mutaciones, y su implicación clínica y pronóstica.
- Aplicar el modelo de riesgo clínico-genético m7-FLIPI en una serie de pacientes con LF no seleccionada, que representa la práctica clínica diaria de un hospital.
- Recopilar los datos obtenidos de los análisis previos realizados con el objetivo de establecer biomarcadores en el momento del diagnóstico que mejoren la estratificación de los pacientes con LF en función de su riesgo.

III) TERCER TRABAJO: ESTUDIO MOLECULAR DE LA PROGRESIÓN Y TRANSFORMACIÓN HISTOLÓGICA DEL LINFOMA FOLICULAR A LINFOMA AGRESIVO. POSIBLES MODELOS DE EVOLUCIÓN CLONAL EN BASE A LA EXPERIENCIA DE UN SOLO CENTRO.

- Caracterización genética del proceso de transformación de LF a linfoma agresivo mediante secuenciación masiva dirigida de biopsias secuenciales, que representan distintos episodios en la evolución de la enfermedad.
 - Detallar las alteraciones características de cada episodio de la enfermedad con el fin de mejorar nuestros conocimientos acerca de la patogénesis del proceso de desarrollo y transformación del LF.
 - Análisis comparativo de las alteraciones genéticas implicadas en el desarrollo del LF con TH, el LF sin TH y el LDCBG *de novo*, CGB y no-CGB según el algoritmo de Hans, en busca de marcadores que identifiquen al grupo de pacientes susceptibles de TH y lo diferencien del LDCBG *de novo*.
 - Analizar en profundidad las alteraciones presentes en la biopsia transformada y descartar su presencia en el resto de episodios de la enfermedad con el objetivo de determinar las lesiones genéticas responsables de la TH.
 - Implicación de las alteraciones genéticas en el tiempo hasta la transformación de los pacientes con TH para detectar marcadores de TH precoz.
 - Esclarecer la dinámica de evolución del clon tumoral de los pacientes con LF que experimentan TH y establecer patrones o modelos de evolución clonal que reflejen los distintos escenarios de la enfermedad.

MATERIAL y MÉTODOS

1. SUJETOS DE ESTUDIO

1.1. Caracterización de la serie global

Se incluyó retrospectivamente un total de **199 pacientes** con linfoma folicular (LF) de nuevo diagnóstico entre enero de 1995 y diciembre de 2017, así como todos aquellos con transformación histológica a linfoma agresivo, independientemente de la fecha de diagnóstico. Todos los casos fueron diagnosticados en el Servicio de Hematología del Hospital Universitario de Salamanca o remitidos al mismo como centro de referencia desde otros centros de la Comunidad de Castilla y León (n=29) para la realización de estudios inmunofenotípicos, citogenéticos y moleculares específicos y la confirmación de su diagnóstico, control y/o seguimiento.

▪ **Criterios de inclusión:** el criterio de inclusión fue el diagnóstico de LF grado 1-3A confirmado histológicamente según la clasificación de la OMS de 2017.¹ Los pacientes con una histología compuesta o linfomas *composite* (LF+LDCBG, n=18) y aquellos con grado histológico 3B (n=23) en el momento del diagnóstico fueron excluidos. De la misma forma, fueron excluidos de los estudios aquellos pacientes sin datos clínicos, pérdida de seguimiento y/o biopsia no disponible para la realización de los estudios pertinentes (n=46).

▪ **Características de la serie:** las características clínico-biológicas de los pacientes con LF incluidos en los tres capítulos de la presente tesis doctoral se describen en la tabla 1. La mediana de edad al diagnóstico de la serie global fue 59 años (intervalo, 19-87) y, del total de los casos, 105 pacientes (53%) eran mujeres. En cuanto al grado histológico, la mitad de los pacientes incluidos (48%) presentaron grado 1 en el momento del diagnóstico y el 65% estadio IV de Ann Arbor, estando el 37% de los casos (n=59) incluidos en el grupo de alto riesgo según el índice pronóstico FLIPI.

▪ **Esquema terapéutico:** el esquema terapéutico manejado en los 199 pacientes con LF incluidos se detalla en la tabla 1 donde puede observarse que, debido a la naturaleza retrospectiva del estudio, se han utilizado diferentes tratamientos estándar durante el periodo de inclusión de los pacientes. Como se puede ver en la tabla 1, 26 pacientes no recibieron ningún esquema terapéutico para el LF hasta la fecha de último seguimiento o transformación histológica a linfoma agresivo, y 4 pacientes recibieron cuidados paliativos sin tratar su LF. Por tanto, de los 199 pacientes incluidos, 169 pacientes (85%) recibieron tratamiento con intención curativa, siendo en su mayoría (61%, 103/169 pacientes) tratados con esquemas de inmunoterapia (IQT) basados en el anticuerpo monoclonal anti-CD20 rituximab (R). En 73/103 pacientes con LF se administró R-CHOP (rituximab - ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, prednisona, 71%), tratamiento de elección en primera línea en nuestra institución de acuerdo con la guía del Grupo Español de Linfomas y Trasplante

Alogénico de Médula Ósea para el tratamiento de LF (GELTAMO, 2018) que concuerda con las directrices de la Sociedad Europea de Oncología (ESMO 2016). De los 30/103 pacientes restantes tratados con otros esquemas de R-IQT, 11 pacientes recibieron rituximab en combinación con bendamustina, 9 en combinación con fluradabina y 6 en combinación con lenalidomida, 3 casos recibieron R-CVP (rituximab - ciclofosfamida, vincristina, prednisona, 3%) y 1 paciente recibió R-COMP como tratamiento para el LF.

Tabla 1. Características clínico-biológicas de los 199 pacientes con LF incluidos.

Variable	Serie global, n (%)
Edad, años (mediana, intervalo)	59 (19-87)
Sexo M/H	105 (53) / 94 (47)
Grado histológico*	
1	87 (47.8)
2	73 (40.1)
3A	22 (12.1)
FLIPI*	
0-1 (Bajo riesgo)	52 (32.7)
2 (Riesgo intermedio)	48 (30.2)
3-5 (Alto riesgo)	59 (37.1)
Ann Arbor*	
I	24 (13.7)
II	18 (10.3)
III	19 (10.9)
IV	114 (65.1)
Terapia en primera línea	
Nunca tratados	26 (13.1)
Cuidados paliativos	4 (2.0)
IQT basada en rituximab	103 (51.8)
R-CHOP	73 (70.2)
R-Bendamustina	11 (10.6)
R-CVP	3 (2.9)
Otros	16 (15.5)
QT sin rituximab	48 (24.1)
CHOP	35 (72.9)
Basados en fluradabina	3 (6.3)
Otros	10 (20.8)
Radioterapia sola o con rituximab	14 (7.0)
Rituximab en monoterapia	4 (2.0)
Mantenimiento con rituximab*	77 (51)
Respuesta tras terapia de inducción	
RC	91 (54.2)
RP	65 (38.7)
NR/Progresión	12 (7.1)

*Dato de grado histológico disponible para 182 (92%) casos; FLIPI para 159 (80%); Ann Arbor para 175 (88%); Mantenimiento calculado sobre 151 (76%) pacientes. CHOP, ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, prednisona; CVP, ciclofosfamida, vincristina, prednisona; FLIPI, Índice pronóstico internacional del LF; IQT, Inmunoquimioterapia; NR, No respuesta; QT, Quimioterapia; R, rituximab; RC, Respuesta completa; RP, Respuesta parcial; TH, Transformación histológica.

El resto de pacientes que recibieron tratamiento para el LF (66/169 pacientes, 39%) incluye 48 pacientes tratados con esquemas quimioterápicos sin rituximab, 14 pacientes que recibieron sólo radioterapia o radioterapia en combinación con rituximab y 4 pacientes que recibieron rituximab en monoterapia.

Por último, se administró tratamiento de mantenimiento con rituximab en 77 casos, 46 en RC y 31 en RP, una vez finalizado el tratamiento de inducción en primera línea.

▪ **Evaluación de la respuesta:** la evaluación de la respuesta tras el tratamiento de inducción en primera línea se basó en el informe del médico responsable en ese momento, según los criterios del *International Working Group*, basada en tomografía computerizada (TC) o tomografía por emisión de positrones con 18[F]fluorodesoxiglucosa (PET-FDG)/TC,²⁻⁴ objetivando respuesta completa en 91 pacientes (54%), 70 casos evaluados por TC y 13 por PET/TC (8 casos sin dato disponible), respuesta parcial en 65 casos, 57 por TC y 5 por PET/TC (3 casos sin dato disponible), y ausencia de respuesta o progresión en 12 pacientes (7%) (Tabla 1).

1.2. Transformación histológica (TH)

La transformación histológica (TH) se definió únicamente en base a criterios patológicos, excluyendo aquellos pacientes con transformación clínica no confirmada histológicamente. Las biopsias se obtuvieron en el momento en que hubo una sospecha clínica de linfoma folicular transformado (LFt), siempre y cuando fuera accesible y el estado físico del paciente lo permitiera. Se consideró como TH una histología de LDCBG, linfoma compuesto, o *composite*, o LF grado 3B. Durante el periodo de inclusión de los pacientes en la presente tesis doctoral, el estudio histológico durante la progresión de la enfermedad fue indicativo de transformación histológica a linfoma agresivo en 48 pacientes con LF (LFt, 24%).

1.3. Distribución de los pacientes

La distribución de los 199 pacientes con LF en los tres capítulos que comprende la presente tesis doctoral, así como el número de muestras y origen de las mismas en cada caso, se detalla en la figura 1. Al principio de cada capítulo se hará una descripción más detallada de los casos incluidos en el mismo.

Se utilizaron como muestras no tumorales pareadas en los capítulos 2 y 3, muestras de médula ósea (MO) o sangre periférica (SP) no infiltradas por técnicas de citometría de flujo, es decir, con 0% de células tumorales, con el objetivo de excluir del análisis los polimorfismos de la línea germinal de cada paciente. Además, se utilizaron muestras de SP de 4 controles sanos jóvenes en el capítulo 2, con el objetivo de eliminar los posibles falsos positivos como consecuencia de los errores en las tecnologías de secuenciación masiva.

Los estudios comprendidos en los tres capítulos fueron aprobados por el Comité Ético del Hospital Universitario de Salamanca de acuerdo con la legislación española y se obtuvo el consentimiento informado de todos los sujetos de estudio siguiendo las recomendaciones de la Declaración de Helsinki.

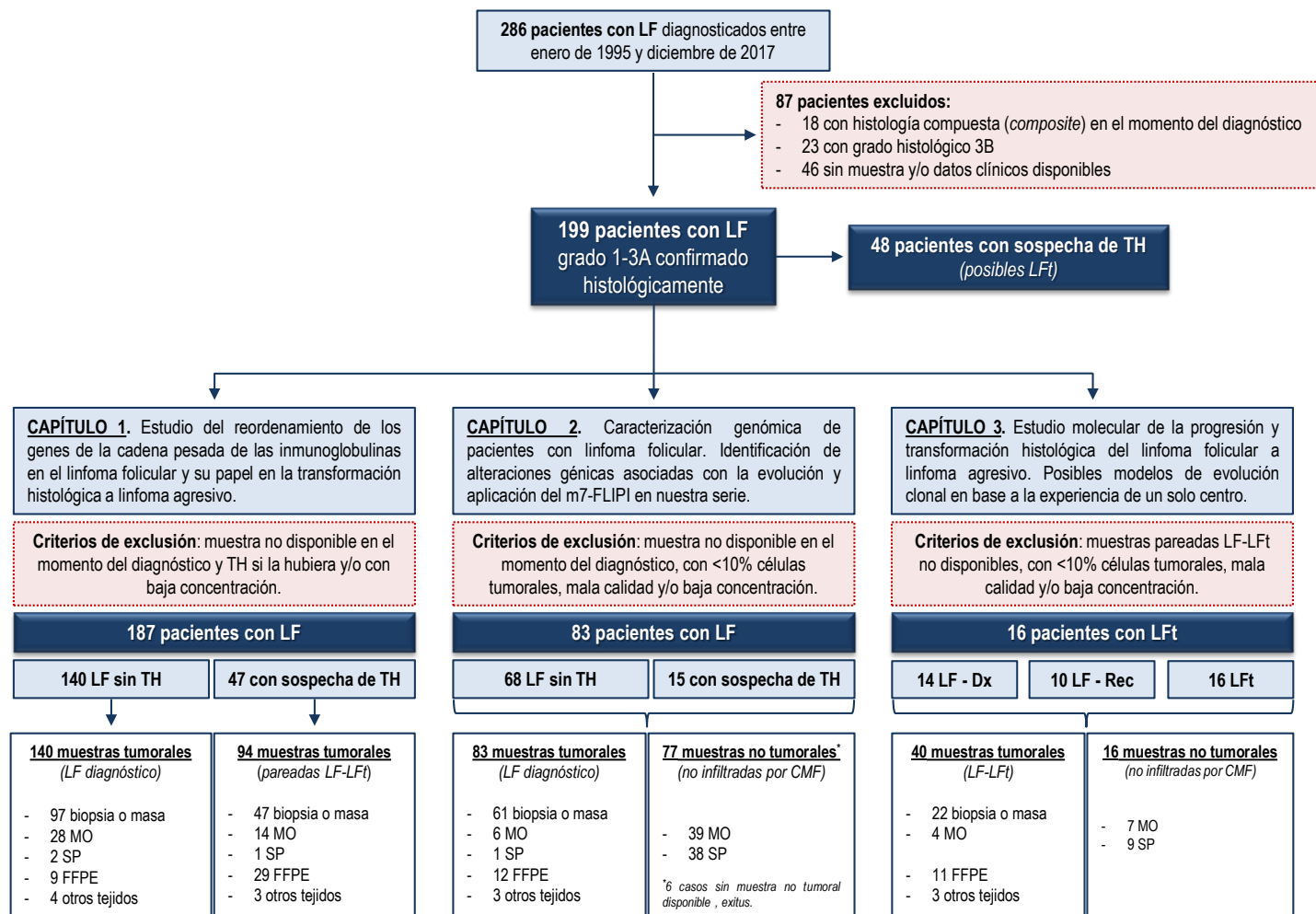


Figura 1. Diagrama de flujo que esquematiza la distribución de los 199 pacientes con LF incluidos en la presente tesis doctoral entre los tres capítulos de los que forma parte. En este diagrama se puede observar tanto el número de muestras incluidas como su origen, además de los criterios de exclusión aplicados en cada trabajo. CMF, citometría de flujo; Dx, diagnóstico; FFPE, tejido parafinado (formalin-fixed paraffin-embedded tissue); LF, linfoma folicular; LFt, linfoma folicular transformado; MO, médula ósea; Rec, recaída; SP, sangre periférica; TH, transformación histológica.

2. METODOLOGÍA GENÉTICO MOLECULAR

2.1. Revisión histológica e inmunofenotípica

Debido a que el diagnóstico de LF se basa en una biopsia del ganglio linfático, en nuestro centro se lleva a cabo de forma rutinaria un diagnóstico basado en criterios histológicos en todos los casos con sospecha de LF. Esto implica que, en todos los pacientes incluidos en los tres capítulos que comprende esta tesis doctoral, se revisó el estudio histológico para confirmar tanto el diagnóstico de LF como la TH documentada a linfoma agresivo en aquellos casos con LFt. En los casos de LFt con histología de LDCBG, se determinó, siempre que fuera posible, la célula de origen en base al algoritmo de Hans (Figura 2).⁵ La revisión fue llevada a cabo por los patólogos responsables del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario de Salamanca.

El estudio inmunofenotípico se lleva a cabo en la práctica diaria en nuestro centro mediante citometría de flujo (CMF) multiparamétrica, tanto en el diagnóstico como en el seguimiento de diversas hemopatías, entre ellas el LF. En todos los pacientes incluidos en los tres trabajos se estudió su inmunofenotipo, conociendo así el porcentaje de infiltración tumoral de la muestra representativa del linfoma. Por tanto, en todos los casos se revisaron los informes electrónicos correspondientes a los estudios de CMF para confirmar su diagnóstico y recoger los datos de infiltración requeridos.

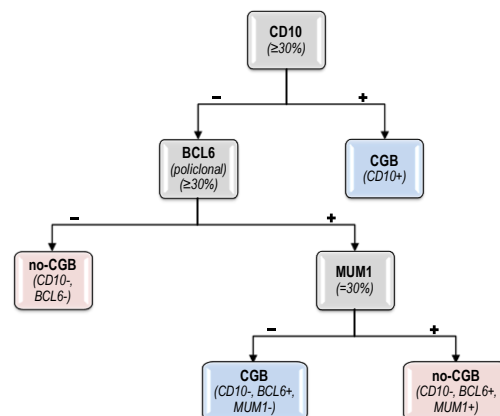


Figura 2. Algoritmo de Hans para determinar mediante inmunohistoquímica la célula de origen (COO) del LDCBG. Figura adaptada de *Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray* (Hans CP, 2004). Representación esquemática del algoritmo de Hans empleado para identificar la COO del LDCBG que resulta de la transformación histológica del LF. En azul se representan los LDCBG tipo centro germinal (CGB) y en rojo los LDCBG tipo no-centro germinal (no-CGB).

2.2. Técnicas citogenéticas: FISH

Se llevó a cabo el estudio de hibridación *in situ* fluorescente (FISH) al diagnóstico de todos los pacientes con sondas para la detección de la traslocación t(14;18). Los estudios de citogenética fueron realizados por los especialistas del Laboratorio de Citogenética Molecular del Servicio de Hematología de nuestro hospital.

2.3. Extracción y control de calidad del ácido desoxirribonucleico (ADN)

2.3.1. ADN de biopsias de adenopatía o masa tumoral en fresco

El ADN procedente de adenopatías o masa tumoral se aisló siguiendo el método estándar de extracción de ADN con fenol:cloroformo.⁶ Previo al uso de fenol:cloroformo, el tejido biopsiado fue sometido a disgregación mecánica para desprender las células de la masa tumoral y estas fueron resuspendidas en solución salina o PBS. A continuación, la muestra fue sometida a digestión con enzimas proteolíticas como la proteinasa K para así eliminar la mayor parte de las proteínas presentes en la muestra.

En las biopsias más recientes, una vez disgregadas y resuspendidas en PBS, el ADN se extrajo con el extractor automático Maxwell[®] 16 System (Promega, Madison, WI, USA). La reciente incorporación al laboratorio de este extractor automático permite aislar de forma automatizada el ADN de capa leucocitaria o de muestras total tratada con EDTA, heparina o citrato, sin procesamiento previo. Este equipo automático utiliza como principio básico de separación la lisis celular, en presencia de un agente caotrópico y detergente, y la unión a partículas de sílice magnetizadas, que posteriormente serán lavadas para separarlas del resto de componentes celulares.

2.3.2. ADN de muestras de MO, SP y otros tejidos

El ADN procedente de muestras de MO, SP y otros tejidos, principalmente líquido pleural y PAAF, fue extraído de acuerdo con el protocolo estándar de extracción con DNAzol[®] (MRC, Cincinnati, OH, USA), un reactivo que permite la precipitación selectiva del ADN ya que contiene detergente y guanidina que hidroliza y promueve su precipitación.⁷ Para ello, previamente fueron extraídos los leucocitos totales de las muestras mediante desplaquetización y posterior lisis de los hematíes a través de un choque térmico con cloruro amónico durante 20 minutos a 4 °C. De esta forma se consigue un botón celular que será recuperado mediante centrifugación a 1500 r.p.m durante 5 minutos. Los leucocitos obtenidos se lavaron con solución salina de Hanks' (GibcoBRL, Life Technologies) para eliminar los posibles restos celulares y luego fueron precipitados mediante centrifugación a 1500 r.p.m durante 5 minutos

La extracción del ADN de las muestras de MO y SP se llevó a cabo con el extractor automático Maxwell® 16 System, descrito en el apartado anterior, a partir de su incorporación al laboratorio.

2.3.3. ADN de tejido parafinado (FFPE)

El tejido parafinado, conservado en el Servicio de Anatomía Patológica del centro, fue solicitado en los casos en que el ADN congelado procedente de tejido fresco no estaba disponible o era de calidad deficiente. Para el aislamiento de ácidos nucleicos en estos casos se emplearon dos métodos distintos, RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation Kit (Ambion/Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) o QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany), siguiendo las indicaciones del fabricante. En cualquier caso, el tejido fue previamente desparafinado utilizando xileno al 100%, un disolvente orgánico conocido como agente aclarante porque torna transparente el tejido al cambiar su índice de refracción. A continuación, tras una serie de lavados con alcohol etílico para eliminar completamente el xileno, el tejido ya desparafinado se sometió a un proceso de digestión mediante la enzima proteinasa K, dejando la muestra preparada para la obtención de ácidos nucleicos con cualquiera de los dos métodos expuestos previamente.

2.3.4. Purificación del ADN para las técnicas de secuenciación de nueva generación

Las técnicas de secuenciación de nueva generación o secuenciación masiva requieren una purificación previa del ADN y su posterior suspensión en un *buffer* de elución conocido con bajo contenido de EDTA ($\leq 0.1\text{mM}$), ya que esta sustancia actúa como agente quelante e interfiere con la función de las enzimas empleadas. Para la purificación del ADN se empleó el kit Genomic DNA Clean & Concentrator TM-10 (Zymo Research, Irvine, California, USA), un sistema de columnas que permiten la sustitución del *buffer* en el que el ADN está suspendido por uno de composición conocida (*DNA Elution Buffer*: 10 mM Tris-HCL, pH 8.5, 0.1 mM EDTA).

2.3.5. Cuantificación y control de calidad del ADN

La concentración del ADN de los casos incluidos en el capítulo 1 de la presente tesis doctoral fue cuantificada utilizando el espectrofotómetro NanoDrop 1000TM (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Por su parte, la concentración del ADN de los casos estudiados en los capítulos 2 y 3 fue cuantificada mediante el fluorímetro Qubit® 2.0 (Invitrogen TM, Eugene, OR, USA), utilizando el kit Qubit dsDNA BR (*Broad-Range*) que permite una cuantificación más precisa y exclusiva del ADN de doble cadena, ya que emplea un fluorocromo que se intercala en esta estructura. La pureza del ADN se evaluó empleando el espectrofotómetro NanoDrop 1000TM (Thermo Fisher Scientific) en base a los ratios de absorbancia 260/280 y 260/230, que permiten

detectar el grado de contaminación por proteínas y solventes orgánicos. Se consideran valores óptimos entre 1.8-2.0 y 1.6-2.4, respectivamente.

En el caso del ADN extraído de tejido parafinado, es necesario ser más riguroso ya que los procesos de parafinado y desparafinado provocan daños moleculares en el ADN como roturas en una o ambas cadenas, desaminación y oxidación de bases, dímeros de timina, etc. (Figura 3), por lo que resulta imprescindible examinar su integridad. Para ello se utilizó el equipo 4200 TapeStation System (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), un sistema de electroforesis automatizado que permite analizar el tamaño e integridad del ADN empleando el ensayo Genomic DNA Assay.

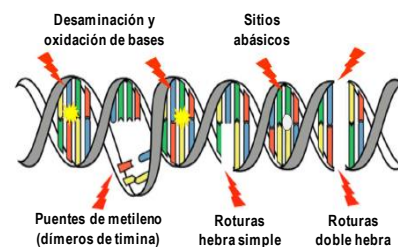


Figura 3. Tipos de daño molecular presentes en el ADN extraído de tejido sometido a un proceso de parafinado.

2.4. Amplificación del ADN mediante PCR estándar

2.4.1. Aspectos generales

Como es bien conocido, PCR (*polymerase chain reaction*) son las siglas por las que se conoce a la reacción en cadena de la polimerasa, técnica cuya introducción tuvo gran relevancia en la biología, en especial en la biología molecular y con impacto en numerosas subdisciplinas de la misma. Esta técnica fue descrita en 1971 por Keppe y colaboradores, pero no fue aplicada experimentalmente hasta 1985 por el estadounidense Kary Mullis. La PCR consiste en la amplificación en cadena de una o varias (PCR múltiple) regiones específicas del ADN, utilizadas como molde, a partir de la extensión de una pareja de cebadores o *primers* (*forward* y *reverse*) con el objetivo de obtener un gran número de copias de la región de interés (Figura 4). La introducción de una ADN polimerasa termoestable obtenida de la bacteria *Thermus aquaticus*, conocida como Taq ADN polimerasa, perfeccionó e hizo aplicable la técnica hasta día de hoy.⁸ Esta técnica será por tanto el principio base de la metodología utilizada en los trabajos que integran los tres capítulos en los cuales está dividida esta tesis doctoral, y se llevó a cabo en todos los casos en un termociclador Veriti de la casa comercial Applied Biosystems.

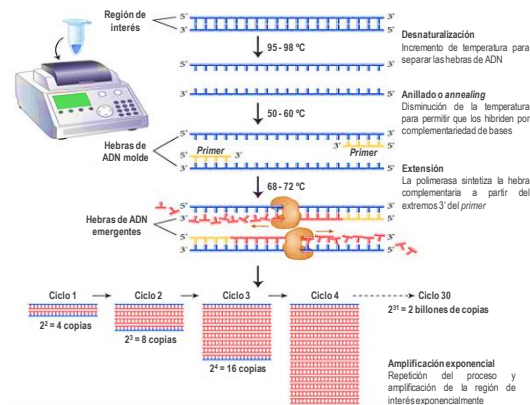


Figura 4. Representación esquemática de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional y las fases que comprende.

2.4.2. Amplificación del reordenamiento V(D)J

▪ Pacientes incluidos:

La amplificación del reordenamiento V(D)J se llevó a cabo en los pacientes con LF incluidos en el capítulo 1 para el estudio de los genes implicados en el reordenamiento de IGH en el momento del diagnóstico (n=187) y, en todos los casos con TH, se llevó a cabo también en la muestra de la transformación (n=48).

▪ Metodología

La amplificación de la secuencia completa del reordenamiento V(D)J de los genes de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (IGH) se llevó a cabo siguiendo el protocolo BIOMED-2.⁹ Este protocolo consiste en una amplificación múltiple con un conjunto de cebadores o *primers* correspondientes y específicos de seis familias de genes IGHV dirigidos a las regiones conservadas FR1, FR2 o FR3, y un *primer* consenso situado en la región FR4 del gen IGHJ marcado con un fluorocromo (5'-6FAM IGHJ) para su posterior detección mediante GeneScan o análisis de fragmentos (Figura 5). La explicación en detalle de la técnica, así como las secuencias de los *primers*, se puede encontrar en la publicación del grupo BIOMED-2 en la que nuestro grupo participó activamente.⁹ Esta amplificación se puede realizar también con *primers* específicos de la región leader 5' (LD) y el *primer* consenso en IGHJ,^{10;11} opción que proporciona la secuencia completa de la región reordenada, con el inconveniente de ser una secuencia muy larga que en ADN fragmentado o de mala calidad no suele amplificar.

Todas las reacciones de PCR se llevaron a cabo en 25 microlitros (µl) de volumen final, que contenían 1 µl de muestra de ADN, 10 picomol (pmol) de cada *primer*, una concentración de 200 micromolar (µM) de deoxinucleósido trifosfato (dNTPs) y 1.5 milimolar (mM) de MgCl₂, además de 1 U de la enzima FastStartTaq DNA Polymerase (Roche Diagnostics, Indianapolis, USA). Se emplearon las condiciones de PCR adaptadas del

protocolo BIOMED-2 que consisten en una preactivación durante 10 min a 95 °C, seguida de 35 ciclos que comprenden una desnaturalización a 94 °C durante 30 s, una fase de *annealing* o anillamiento durante 30 s a 60 °C y una extensión de 30 s a 72 °C, seguidos de una extensión final durante 30 min a 72 °C.

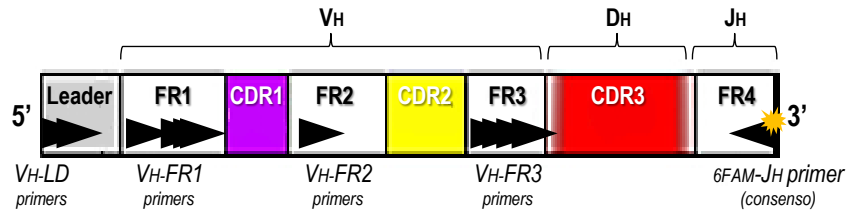


Figura 5. Representación esquemática de dónde se sitúan los primers utilizados para la amplificación del reordenamiento V(D)J. Figura adaptada de *Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: Report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936* (Van Dongen JJM, 2003).

2.4.3. Nested PCR para t(14;18)(q32;q31)

▪ Pacientes incluidos

La amplificación de la t(14;18) se llevó a cabo en todos los pacientes con LF incluidos en los tres capítulos (n=199) en el momento del diagnóstico. En los pacientes con LFt se estudió la traslocación también en el momento de la transformación (n=48), utilizando el punto de corte o *breakpoint* y el tamaño del fragmento amplificado como marcadores de relación clonal en aquellos casos en los que la secuencia VDJ no pudo ser identificada.

▪ Metodología

La amplificación de esta traslocación se realizó utilizando una variante de la PCR convencional denominada *nested* PCR o PCR anidada adaptada de Gribben *et al.*, utilizando *primers* dirigidos a MBR (*major breakpoint region*) o mcr (*minor breakpoint cluster region*) en el cromosoma 18, y un *primer* consenso dirigido al gen IGHJ en el cromosoma 14 marcado con un fluorocromo (5'-6FAM IGHJ) para su posterior detección mediante GeneScan o análisis de fragmentos. Esto implica que sólo habrá amplificación si ambos cromosomas están reordenados.¹² En primer lugar se realizó la reacción para la t(14;18) con MBR como punto de corte, ya que es el más frecuente, y los casos negativos fueron amplificados con los *primers* para mcr. Esta técnica consiste en dos rondas de amplificación con distintos pares de *primers*, incrementando así la sensibilidad y la especificidad de la detección de la región de interés, en este caso de la t(14;18). En la primera reacción de amplificación se utilizó una pareja de *primers* externos, obteniendo un producto final que comprende una región extensa de ADN amplificado dentro de la que se encuentra la región de interés o segmento diana. Sobre este

producto de PCR se llevó a cabo una segunda reacción de amplificación utilizándolo como molde, con una pareja de *primers* internos que flanquean la región diana específica.

Todas las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 50 μ l, con los *primers*, externos e internos a concentraciones de 20 μ M, aquellos situados en el cromosoma 18, y a 10 μ M los situados en el cromosoma 14. La primera reacción contaba con 2.5 μ l de ADN, mientras que la segunda reacción de PCR partía de 5 μ l de producto de la primera. En ambas rondas de PCR, tanto para MBR como para mcr, se emplearon las siguientes condiciones de PCR: preactivación durante 10 min a 94 °C, seguida de 35 ciclos que comprenden una desnaturalización a 94 °C durante 15 s, una fase de annealing o anillamiento durante 20 s a 55 °C y una extensión de 45 s a 72 °C, seguidos de una extensión final durante 5 min a 72 °C.

2.5. Análisis de fragmentos (GeneScan)

2.5.1. Aspectos generales

La técnica GeneScan o análisis de fragmentos consiste en una electroforesis capilar automatizada en un sistema de capilares llenos de una matriz polimérica semejante a la acrilamida, que permite la separación de los fragmentos de ADN contenidos en una muestra en función de su tamaño. Los equipos de electroforesis automatizada llevan incorporado un sistema láser y un fotodetector que permite la detección de señales de fluorescencia. Este método permite la detección de cambios o alteraciones génicas que tengan como consecuencia un cambio en el tamaño de una región específica, como es el caso por ejemplo de reordenamientos génicos, inserciones o deleciones. Para ello, es necesaria la amplificación previa de la región de interés mediante PCR utilizando un *primer* marcado con un fluorocromo que haga posible la detección del producto, separado en función de su tamaño, mediante emisión de fluorescencia. Esta técnica se llevó a cabo en los secuenciadores automáticos ABIPrism 3100 y 3500 XL Genetic Analyzers (Applied Biosystems) que cuentan con 4 y 24 capilares, respectivamente.

Para poder identificar el tamaño de los fragmentos analizados es imprescindible contar con un marcador de peso molecular (Internal Lane Standard 600, Promega), mezclando 0.3 μ l de este marcador con 1 μ l del producto de PCR y 10 μ l de formamida desionizada, que favorece la separación por desnaturalización de las cadenas del ADN en forma de hebra simple.

2.5.2. Detección de clonalidad

▪ Pacientes incluidos

La técnica GeneScan se empleó en la detección de clonalidad en los pacientes con LF (n=187) al diagnóstico incluidos en el capítulo 1 y en todos los pacientes con LFt (n=48) en el momento del diagnóstico y de la transformación, con el fin de identificar la presencia de un reordenamiento de IGH clonal correspondiente al clon tumoral predominante en el que estudiaremos los genes implicados mediante secuenciación del ADN, como veremos más adelante.

▪ Interpretación de los resultados

Para la visualización e interpretación de los resultados se utilizó el visor GeneMapper v5.0 (Applied Biosystems), considerando monoclonal la presencia de un único pico, con una altura de al menos el doble de la distribución normal o fondo policlonal, que corresponde al reordenamiento clonal de la población de células B tumorales. El tamaño del pico monoclonal debe estar en concordancia con la longitud en pares de bases (pb) del fragmento amplificado (LD, 400-500 pb; FR1, 310-360 pb; FR2, 250-295 pb; o FR3, 100-170 pb). Si se detectan 2 o más picos de estas características, consideraríamos el caso como oligoclonal o policlonal, no pudiendo estudiar en estos el uso de genes involucrados en el reordenamiento V(D)J. En la Figura 6 se pueden observar ejemplos de casos monoclonales, oligoclonales y policlonales detectados por GeneScan.

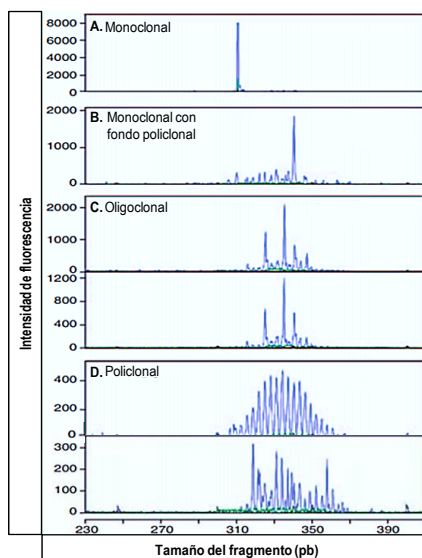


Figura 6. Ejemplos de reordenamientos V(D)J detectados mediante la técnica GeneScan. Figura adaptada de *EuroClonality/BIOMED-2 guidelines for interpretation and reporting of Ig/TCR clonality testing in suspected lymphoproliferations* (Langerak AW, 2012). En la figura se muestran ejemplos de casos con reordenamiento (A) monoclonal, (B) monoclonal con fondo policlonal, (C) oligoclonal o múltiples productos y (D) policlonal regular e irregular, respectivamente.

2.5.3. Detección de la t(14;18)(q32;q31)

▪ Pacientes incluidos

La técnica GeneScan se utilizó también para la detección de la t(14;18) en todos los casos incluidos en el momento del diagnóstico (n=199), así como en el momento de la transformación en los LFl (n=48), siendo de gran utilidad como marcador de relación clonal en los casos en que no se pudo detectar la clonalidad.

▪ Interpretación de los resultados

A partir del producto de la *nested* PCR realizada para la amplificación de la t(14;18), se llevó a cabo la detección de esta traslocación mediante análisis de fragmentos, visualizando los resultados con el visor GeneMapper v5.0. A diferencia de la detección de clonalidad en la que siempre hay producto, aquí veremos un pico exclusivamente en los casos positivos para esta traslocación. Por esta razón es necesario incluir un control positivo en cada reacción, ya que consideraremos negativos los casos con ausencia de amplificación siempre y cuando en el control haya amplificación. El tamaño del fragmento amplificado correspondiente a la región traslocada, constituido por parte del cromosoma 18 y parte del 14, es característico de cada paciente y se puede utilizar como marcador de seguimiento o de enfermedad mínima residual (EMR) en el LF.

Los resultados obtenidos por FISH y *nested* PCR fueron combinados para reportar los casos positivos y negativos para esta traslocación, ya que su uso combinado incrementa la sensibilidad en la detección de la t(14;18) en comparación con su utilización de forma aislada.¹³ Por tanto, se interpretaron como casos positivos para la t(14;18) aquellos positivos por FISH y/o *nested* PCR, mientras que sólo se interpretaron como negativos aquellos que lo fueron por FISH en muestras con un mínimo de infiltración tumoral del 10%. Esto se debe a que el cromosoma 18, como se comentó previamente en la introducción, presenta multitud de puntos de corte de los cuales sólo se estudian por PCR los dos más frecuentes, MBR y mcr. Por el contrario, debido a que la técnica FISH utiliza un mecanismo basado en hibridación de sondas, se puede detectar la traslocación independientemente del punto de corte, aunque la sensibilidad sea menor.

2.6. Secuenciación convencional del ADN (Sanger)

2.6.1. Aspectos generales

La técnica de secuenciación convencional o Sanger consiste en la síntesis enzimática del ADN a partir de un ADN molde enriquecido y purificado por complementariedad de bases.^{14;15} Para ello es imprescindible el uso de terminadores de cadena, es decir, dideoxinucleótidos trifosfato (ddNTPs: ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP)

carentes del grupo hidroxilo 3'-OH necesario para establecer el enlace fosfodiéster con el grupo fosfato del siguiente nucleótido de la cadena de ADN. El flujo de trabajo de la secuenciación Sanger se puede resumir en tres fases: preanalítica, analítica y postanalítica, detalladas a continuación.

▪ **Fase preanalítica.** La secuenciación Sanger requiere una fase denominada preanalítica que finaliza con la obtención del ADN molde enriquecido y purificado. Esta fase consiste en el enriquecimiento mediante amplificación por PCR del fragmento de interés y la purificación del amplicón o producto de la PCR obtenido en la amplificación para eliminar los oligonucleótidos iniciadores, enzimas, sales, solventes orgánicos o detergentes que puedan interferir en la secuenciación. La purificación se llevó a cabo de manera enzimática tratando el producto de PCR con Illustra™ ExoProStar™ (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA). Para ello se mezclaron 10 µl del producto de PCR con 1.5 µl de ExoProStar, incubando la mezcla en un termociclador Veriti durante 15 min a 37 °C para que actúe la enzima, seguidos de 15 min a 80 °C para inactivarla.

▪ **Fase analítica - Reacción de secuenciación:** La reacción de secuenciación es una reacción de PCR modificada y combinada con una reacción de extensión de un solo nucleótido, basada en la adición de ddNTPs marcados con un fluorocromo específico de cada base nitrogenada. La introducción de un ddNTP conlleva la terminación de la extensión del producto de ADN, obteniendo como resultado de la reacción una mezcla enriquecida de productos de ADN de cadena simple que difieren entre sí en longitud de un único nucleótido por la incorporación de ddNTPs. Esta reacción de secuenciación se realizó en un termociclador Veriti utilizando 1 µl de uno de los primers no marcados empleados en la amplificación mediante PCR (forward o reverse) a concentración 3.2 µM, 0.75 µl de BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Reaction kit (Applied Biosystems, Foster City, CA), 1.25 µl de Buffer 5x Terminator v1.1 Cycle Sequencing Reaction kit, 5 µl de agua estéril libre de nucleasas y 2 µl de ADN purificado con ExoProStar que resultó de la fase preanalítica. Las condiciones de la reacción consistieron en una primera fase de preactivación de la enzima a 96 °C durante 1 min seguida de 25 ciclos que comprenden una desnaturalización a 96 °C durante 10 s, una fase de annealing a 50 °C durante 5 s y una extensión a 60 °C durante 1 min 15 s.

▪ **Fase analítica - Electroforesis capilar y lectura de secuencia:** Antes de la electroforesis capilar, es obligado un paso previo de purificación por precipitación con acetato de sodio y EDTA a 125 mM, en proporción 1:1, y etanol absoluto y diluido al 80%. Esto permitió la obtención de un producto puro resuspendido en 20 µl de formamida que se sometió a electroforesis capilar en el secuenciador automático ABIPrism 3500 XL Genetic Analyzers. El proceso de electroforesis genera un alineamiento de todos los productos en función de su tamaño de forma que los de menor tamaño son los primeros en llegar al fotodetector. Por tanto, la población de moléculas se separó por tamaños y la secuencia se obtuvo correlacionando el orden de los fragmentos en la

electroforesis con el didesoxinucleótido que termina cada uno de ellos, transformando las señales lumínicas en una secuencia de ddNTPs que corresponde a la secuencia de la hebra de ADN de interés.

▪ **Fase postanalítica:** La secuenciación Sanger permite identificar y secuenciar mutaciones puntuales, polimorfismos de un solo nucleótido, indels (inserciones o deleciones) y reordenamientos génicos presentes en más del 10% de las células analizadas. Para la visualización y análisis de calidad de la secuencia se empleó el software Sequencing Analysis v5.4 (Applied Biosystems) donde, a través de un código de colores, podemos conocer la secuencia de nucleótidos del fragmento secuenciado, así como la calidad y fiabilidad de la secuenciación, en función de si la lectura de cada posición resultó o no homogénea.

2.6.2. Secuenciación Sanger del reordenamiento V(D)J

▪ **Pacientes incluidos**

Se aplicó secuenciación convencional o Sanger en los pacientes con LF en el momento del diagnóstico (n=187) y en los LFt tanto en la muestra del diagnóstico como de la transformación (n=47) incluidos en el capítulo 1, en los que se llevó a cabo la amplificación del reordenamiento V(D)J y fueron clonales por GeneScan.

▪ **Metodología**

Mediante la técnica de análisis de fragmentos descrita en el apartado 2.5 se detectaron los casos con reordenamiento V(D)J clonal, a partir de los productos de la amplificación llevada a cabo siguiendo el protocolo BIOMED-2 (apartado 2.4.2). Los casos clonales fueron secuenciados por secuenciación Sanger, utilizando en la reacción de secuenciación un *primer* consenso situado en la región conservada del gen IGHJ con la misma secuencia que el *primer* utilizado en la amplificación, pero sin marcaje fluorescente.⁹ De esta forma obtuvimos la secuencia del segmento IGHV en cada caso, que permitió la identificación de la familia o subgrupo y del gen concreto IGHV utilizado, imprescindible para el desarrollo del capítulo 1 de la presente tesis doctoral.

A continuación, se llevó a cabo la secuenciación desde el segmento IGHV utilizando el *primer* correspondiente a la familia y al fragmento amplificado en cada caso (principalmente LD o FR1), determinando así la secuencia completa del reordenamiento V(D)J.

▪ **Interpretación de los resultados (IMGT/V-QUEST)**

La secuencia de nucleótidos obtenida como producto de la secuenciación Sanger que visualizamos mediante el Sequencing Analysis v5.4 fue testada a través del software IMGT/V-QUEST (<http://www.imgt.org>). Este software online permite la identificación de los genes IGHV, IGHD e IGHJ mediante su alineamiento con la

secuencia del gen de las Igs de la línea germinal y las secuencias del directorio de referencia propio de IMGT. Además, reporta las características estructurales importantes, los marcos de lectura, las regiones determinantes de la complementariedad y la identificación y localización de las mutaciones somáticas de los segmentos génicos reordenados, dando un porcentaje de identidad con la línea germinal.¹⁶

Por tanto, una vez copiada la secuencia de nucleótidos de cada uno de los casos y comparada con la base de datos del IMGT, se obtuvo un cuadro resumen donde se refleja el uso de los diferentes segmentos génicos o genes (IGHV, IGHD e IGHJ), así como la secuencia aminoacídica del CDR3 y el porcentaje de identidad de la secuencia del paciente con la línea germinal. La diferencia entre dichas secuencias coincidirá por tanto con el estado mutacional de IGHV o tasa de HMS. Fueron consideradas “mutadas” las secuencias con una tasa de HMS igual o mayor del 2%, es decir, los casos que presentaron una identidad igual o menor al 98% con la línea germinal. Por el contrario, se consideraron secuencias “sin HMS” o “no mutadas”, aquellas con una tasa de HMS menor del 2% o ausente, es decir, aquellas con más del 98% de identidad con la línea germinal.

2.7. Secuenciación de nueva generación (Next Generation Sequencing, NGS)

2.7.1. Aspectos generales

La secuenciación de nueva generación (NGS, por sus siglas en inglés), también denominada secuenciación masiva o ultrasecuenciación, presenta la característica fundamental de secuenciar en paralelo y de forma simultánea millones de fragmentos de ADN, a diferencia de la secuenciación Sanger, correspondientes a uno o varios casos diferentes ofreciendo un rendimiento en la escala gigabase (Gb). Los términos referentes a NGS más utilizados y sus definiciones se detallan en el anexo I.

La secuenciación masiva presenta numerosas aplicaciones, siendo la secuenciación del ADN o *DNA-seq* la aplicación más estandarizada a día de hoy. Esta aplicación permite secuenciar tanto el genoma (*whole-genome sequencing*) o el exoma (*whole-exome sequencing*) completo de un organismo, como regiones concretas o dirigidas (*targeted sequencing*), resultando más aplicable en el ámbito clínico. Todas ellas ofrecen la posibilidad de identificar cambios de un solo nucleótido, indels y grandes reorganizaciones genómicas en múltiples regiones de manera simultánea con elevada sensibilidad, ya que cada posición se lee y secuencia numerosas veces. Esta característica permite identificar fragmentos o cambios discordantes que se encuentran poco representados en la muestra, siendo una aplicación útil para la detección de EMR.

La secuenciación dirigida o *targeted sequencing* es la aplicación de la NGS que se desarrolló en los trabajos de la presente tesis doctoral, y se basa en el diseño de paneles específicos dirigidos al estudio de genes o regiones concretas que permiten la detección de alteraciones génicas de interés para la patología en estudio.

Se pueden usar paneles dirigidos comerciales, con un diseño cerrado, o como en el caso de este trabajo, paneles personalizados de diseño propio (panel *custom*), utilizando herramientas informáticas para su diseño. El principio base de estos paneles dirigidos es la separación de las regiones de interés del resto de moléculas de ADN del genoma, obteniendo un producto final para la secuenciación enriquecido con la región de interés cientos a miles de veces comparado con el resto del genoma.¹⁷ Para ello, se pueden utilizar diferentes estrategias en función de diversos factores, siendo las principales aquellas basadas en PCR (tecnología de amplicones) o en hibridación mediante sondas biotiniladas (tecnología de captura). Un aspecto importante a la hora de escoger entre las distintas estrategias es el origen del ADN que se vaya a secuenciar, es decir, el tipo de muestra de partida, ya que la tecnología de amplicones no es recomendable para ADN fragmentado como puede ser el extraído de muestras parafinadas. A continuación, se definirá cada una de ellas, recogiendo sus características principales, sus ventajas y desventajas.

- Tecnología de amplicones: estrategia basada en la amplificación por PCR de las regiones de interés mediante múltiples *primers* que las flanquean, permitiendo partir de una cantidad limitada de ADN. Este tipo de tecnología presenta dos pasos principales que consisten en la generación de los amplicones, mediante síntesis y amplificación por PCR a partir de *primers*, y ligación en cada extremo del amplicón de un índice (*index* o *barcode*) específico para cada muestra, además de un adaptador con una secuencia compatible con la plataforma donde tendrá lugar la secuenciación. La principal ventaja de utilizar esta estrategia es la brevedad de su proceso. Sin embargo, es incompatible con muestras fragmentadas o parcialmente degradadas, y presenta poco rendimiento en secuencias con regiones repetitivas o con alto contenido en guanina-citosina (GC). Por otro lado, la presencia de indels o mutaciones puntuales en la región de unión del *primer* resultaría en la ausencia de amplificación y pérdida de estas secuencias.
- Tecnología de captura: estrategia basada en la hibridación de sondas a las regiones de interés por complementariedad de bases. Estas sondas son secuencias de nucleótidos de hebra simple biotiniladas con una longitud mayor que un *primer*. La metodología de captura incluye tres pasos principales: fragmentación mecánica o enzimática del ADN, amplificación y ligación de los adaptadores, y enriquecimiento de las regiones de interés mediante hibridación de las sondas. La principal ventaja de esta tecnología es que permite la presencia de *mismatches* en la región de hibridación, además de permitir la secuenciación y análisis de las regiones flanqueantes de esta región (región *off-target*). Esto resulta una ventaja siempre y cuando no haya un desequilibrio a favor de la fracción *off-target*, ya que llegados a este punto se convertiría en un inconveniente.¹⁸ Por otro lado, la estrategia de captura presenta la desventaja de ser sensible a la composición nucleotídica de

la muestra, lo que implica que las secuencias ricas en adenina-timina (AT) o GC podrían perderse debido a una hibridación pobre o a la formación de estructuras secundarias.¹⁹

En cuanto a las plataformas de secuenciación, podemos hablar de distintos tipos en función de la química que utilizan y el tipo de secuenciación que llevan a cabo.²⁰ En el caso de la secuenciación por síntesis, podemos hablar de dos tipos principales: plataforma Illumina (Illumina Inc., San Diego, CA, USA), basada en la secuenciación por síntesis utilizando nucleótidos terminadores (ddNTPs) marcados con moléculas fluorescentes, registrando las señales de fluorescencia que emiten de forma similar a la secuenciación convencional o Sanger, pero pudiéndose incorporar ddNTPs diferentes en distintas moléculas al mismo tiempo; y plataforma Ion Torrent (Thermo Fisher Scientific), basada en la secuenciación por síntesis mediante adición de un solo tipo de nucleótido durante cada ciclo, registrando los cambios de pH o cambios en la concentración de protones que se transforman en señales digitales mediante chips semiconductores. Ambas plataformas son comparables reportando secuencias útiles para la detección de alteraciones.²⁰⁻²³ Sin embargo, la plataforma Illumina por lo general presenta una baja tasa de errores, con una tasa de precisión global por encima de 99.5%.²⁴ La mayoría de los errores que pueden producirse se acumulan en los extremos de los amplicones, en el caso de estar usando esta tecnología, y en regiones ricas en AT y también en GC, donde la hibridación tanto de sondas como de *primers* podría ser más pobre.^{25;26} Además, esta tecnología es menos susceptible a los errores en regiones homopolímeras a diferencia de la plataforma Ion Torrent que presenta elevada tasa de errores en estos casos. El principal inconveniente de la plataforma Illumina es que en cada ciclo de incorporación se introducen errores que se muestran con una señal elevada debido a que se va acumulando y aumentando progresivamente.

En los capítulos de la presente tesis doctoral que incorporan secuenciación masiva, esta se llevó a cabo empleando la plataforma MiSeq de Illumina, por lo que la información detallada a continuación será referida a este secuenciador. El funcionamiento de este tipo de plataforma se puede resumir en los siguientes pasos (Figura 7):

1. Hibridación de los fragmentos de ADN y extensión: los fragmentos de ADN desnaturalizados y preparados para su secuenciación integran unos adaptadores propios y compatibles con todas las plataformas de Illumina denominados P5 y P7, que permiten su hibridación por complementariedad de bases a oligonucleótidos unidos covalentemente al soporte sólido de vidrio donde tiene lugar la secuenciación, conocido como *flow cell* o celda de flujo. La *flow cell* está diseñada para disponer el ADN de manera que facilite el acceso a las enzimas garantizando una baja unión inespecífica de nucleótidos marcados. A continuación, tiene lugar la síntesis de un fragmento complementario a partir del extremo 3' del oligonucleótido adherido a la *flow cell* por una polimerasa. Los fragmentos

originales son eliminados mediante un lavado, manteniéndose únicamente el fragmento de ADN unido covalentemente a la *flow cell*.

2. Amplificación y generación de cluster: la amplificación de los fragmentos de ADN unidos de forma covalente al soporte de secuenciación tiene lugar mediante PCR tipo puente como se muestra en la figura 7, con el objetivo de crear múltiples copias (~1000 copias) a partir del fragmento inicial dando lugar a un conjunto de fragmentos idénticos denominado *cluster*, que presentan un diámetro de una micra o menor.^{20;27} La formación de *cluster* permite la amplificación de la señal emitida hasta una intensidad adecuada para ser detectada, ya que ésta será el consenso de las emitidas por todos los nucleótidos incorporados a cada uno de los fragmentos que conforman el *cluster*.
3. Secuenciación por síntesis: la secuenciación, como se comentó previamente, se basa en la técnica de terminación reversible cíclica (TRC) utilizando ddNTPs marcados con una molécula fluorescente pudiendo detectar hasta cuatro señales de fluorescencia distintas, una por cada tipo de nucleótido. El término “cíclica” corresponde a la repetición de las siguientes fases: incorporación de un ddNTP marcado a la cadena en formación, lavado del resto de nucleótidos no incorporados, lectura de la señal de fluorescencia emitida y eliminación tanto de la molécula fluorescente como del bloqueo dejando el extremo 3'-OH libre para la incorporación de siguiente nucleótido.²⁰ Por tanto, la incorporación de una mezcla de los cuatro ddNTPs junto con la polimerasa es considerada el inicio de un ciclo de secuenciación. El número de ciclos que comprende la secuenciación dependerá de la longitud del fragmento que se quiera secuenciar y de la longitud de lectura fijada, y determinará la duración de la secuenciación. Este tipo de plataforma permite la secuenciación del fragmento por uno (*single-end*) o por ambos extremos (*paired-end*).
4. Lectura de señal de fluorescencia: cada vez que un nucleótido es incorporado a la cadena emite una señal de fluorescencia tras ser excitado mediante láseres. En este punto del ciclo se realiza una imagen que registra la señal de fluorescencia emitida y, por lo tanto, el tipo de nucleótido incorporado, registrando una imagen de cada base (en todos los cluster) y agrupando un total de cuatro imágenes en cada ciclo. A continuación, la molécula fluorescente será eliminada dando paso a la incorporación del siguiente nucleótido. Finalmente las imágenes recopiladas en cada uno de los ciclos se analizan para identificar la secuencia completa.

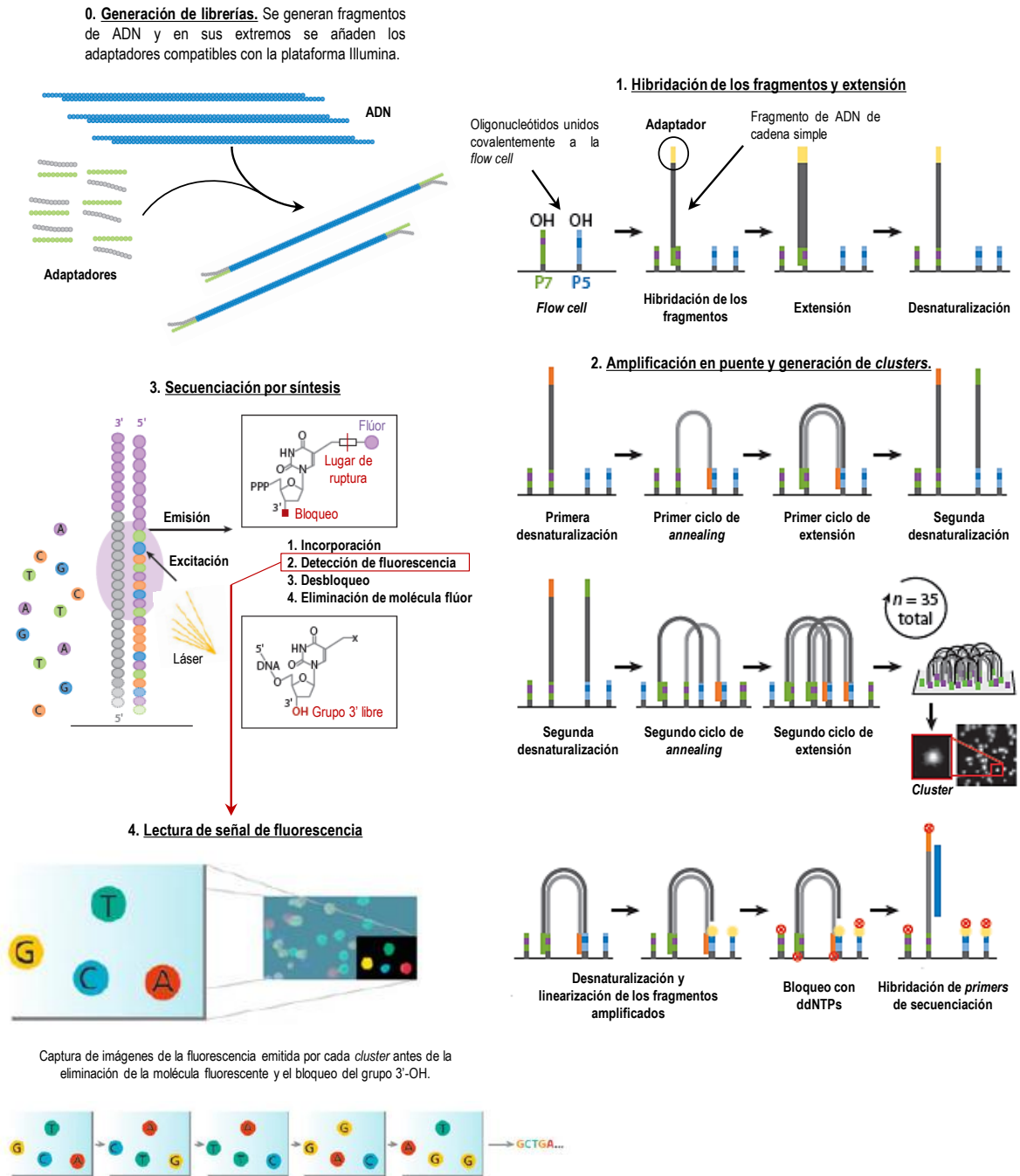


Figura 7. Proceso de secuenciación por síntesis llevado a cabo por la plataforma Illumina. Figura adaptada de *Next-generation sequencing platforms* (Mardis ER. 2013) y *Next-generation DNA sequencing methods* (Mardis ER. 2008). Una vez generada la librería e introducida en forma de cadena simple en el secuenciador, tiene lugar la hibridación de los fragmentos a los oligonucleótidos unidos a la flow cell. En este momento, comienza la amplificación de estos fragmentos por PCR tipo puente dando lugar a la formación de los clusters o conjuntos de moléculas de ADN idénticas entre sí. A continuación, son introducidos los cuatro ddNTPs marcados con moléculas fluorescentes para dar comienzo a los ciclos de secuenciación. Cada ciclo comprende la introducción de un ddNTP marcado, lavado y eliminación de los ddNTPs no incorporados y la ADN polimerasa, lectura de la señal de fluorescencia mediante la realización de una imagen, y eliminación del bloqueo en 3'-OH y de la molécula fluorescente, dejando libre el extremo 3' para el inicio del siguiente ciclo. Al final de la secuenciación, estas imágenes serán ordenadas y traducidas en una secuencia de nucleótidos.

▪ **Flujo de trabajo**

En general, los métodos de NGS dirigidos incluyen cuatro pasos principales: preparación de la muestra y generación de librerías, secuenciación, generación de datos y análisis propio por parte del usuario. El flujo de trabajo de los métodos de secuenciación masiva dirigidos se puede dividir en cuatro fases resumidas en la Figura 8 y detalladas a continuación.

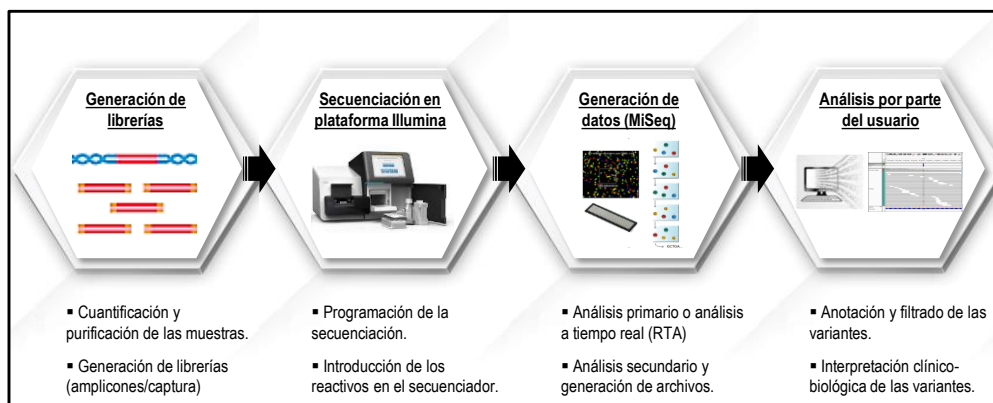


Figura 8. Flujo de trabajo de la secuenciación masiva en la plataforma MiSeq de Illumina.

1. Preparación de la muestra y generación de librerías:

La secuenciación masiva o NGS requiere una muestra de partida de buena calidad o, al menos, que cumpla unos requerimientos mínimos para obtener buen rendimiento de la secuenciación. Los métodos para cuantificar y evaluar la calidad del ADN se describieron en el punto 2.3.5, siendo los mínimos requeridos dependientes del tipo de tecnología que se vaya a utilizar, así como del tipo de protocolo de preparación de librerías que se vaya a seguir.

La preparación de librerías consiste en generar una colección de fragmentos homogéneos en cuanto a tamaño a partir de una muestra de ADN genómico, mediante amplificación por PCR o mediante fragmentación enzimática o mecánica. A estos fragmentos de tamaños homogéneos se les liga una secuencia de 6-8 nucleótidos que identifica cada muestra, denominada índice o *index*, además del adaptador que contiene los *primers* de secuenciación y las secuencias P5 y P7 compatibles con todas las plataformas de secuenciación de Illumina, cuyo funcionamiento se describió previamente. En los casos en los que se hable de secuenciación dirigida o paneles dirigidos, las librerías generadas estarán enriquecidas en las regiones de interés, ya sea mediante amplificación o mediante hibridación con sondas biotiniladas.

Una vez generadas, las librerías deben ser cuantificadas utilizando métodos fluorimétricos, como el Qubit®, o el kit comercial KAPA Library Quantification Kit (KAPA Biosystems, Roche NimbleGen Inc., Madison, WI) de PCR cuantitativa (qPCR), siguiendo las indicaciones del fabricante. La calidad de las librerías se

determina por el tamaño medio (dependiente del tipo de estrategia y protocolo empleado) y por la ausencia de dímeros de adaptadores y/o *primers* de la PCR, y para su evaluación se emplean equipos de electroforesis capilar de alta resolución como 2100 Bioanalyzer Instrument (Agilent) o 4200 Tape Station (Agilent).

2. Secuenciación en plataforma Illumina (MiSeq):

En primer lugar, es necesario programar la secuenciación, para lo que se necesita:

- Archivo *Sample sheet* (obligatorio): fichero delimitado por comas (.csv) que almacena la información para configurar y llevar a cabo un experimento de secuenciación. Este archivo contiene la lista de muestras que incluye el experimento, los índices de cada una de ellas junto con sus secuencias, el flujo de trabajo a emplear, la longitud de lectura deseada, así como otros parámetros específicos para la secuenciación. La *sample sheet* debe ser nombrada con el mismo código que el cartucho de secuenciación que se va a emplear.
- Archivo *Manifest* (opcional): documento de texto que incluye las coordenadas genómicas de las regiones de ADN de interés. Este fichero será necesario siempre y cuando se utilicen los *softwares* de alineamiento y llamada de variantes propios del secuenciador (que se describirán a continuación). En el caso de utilizar *pipelines* o herramientas bioinformáticas ajenas a la plataforma Illumina, no será necesario incorporar este archivo.

Una vez preparado, se deben introducir en el secuenciador los reactivos de secuenciación (reactivos de un solo uso) en el siguiente orden, según los vaya solicitando el secuenciador:

- *Flow cell* o celda de flujo, una vez limpia con agua milliQ y etanol al 80%, y completamente seca con papel especial.
- Botella del tampón de lavado (PR2)
- Cartucho de reactivos, consumible que consta de depósitos numerados y sellados metálicamente donde se encuentran los diferentes reactivos para la secuenciación. El pool de librerías generadas será cargado en este mismo cartucho, en la posición 17 etiquetada como "*Load Samples*".

3. Generación de datos por el secuenciador (MiSeq):

El secuenciador MiSeq lleva a cabo dos tipos de análisis a través de distintos *softwares* integrados en el equipo. El análisis primario o análisis a tiempo real (RTA, *real time analysis*) consiste en recoger y procesar las imágenes realizadas en cada ciclo de secuenciación para extraer las intensidades y localizaciones de los *cluster*, que serán ordenadas y almacenadas. Según el tipo de fluorescencia y la localización del *cluster* con mayor intensidad se establece la secuencia mediante un proceso conocido como *base calling* o llamada de bases,

asignando un valor de calidad (Q) a cada una de ellas. Este proceso tiene lugar durante los ciclos de secuenciación, lo que ahorra tiempo de análisis posterior y permite decidir rápidamente si su ejecución avanza sin errores o no.

Una vez finalizada la carrera de secuenciación comienza el análisis secundario utilizando el software *MiSeq Reporter* (MSR), que inicia con el demultiplexado, es decir, la separación de las secuencias que resultan del *base calling* en función de sus índices generando archivos primarios conocidos como FASTQ (dos por muestra correspondientes a cada dirección de lectura en la secuenciación *paired-end*) que contienen las lecturas de secuencia en formato FASTA sin alinear (“datos crudos”). A continuación, tiene lugar el alineamiento de las lecturas frente al genoma de referencia seleccionado, generalmente GRCh37/hg19, a través del algoritmo Smith-Waterman, generando archivos alineados tipo BAM (.bam). A partir de estos archivos alineados, la herramienta *Somatic Variant Caller* lleva a cabo lo que se conoce como *variant calling* o llamada de variantes, es decir, compara las lecturas alineadas con el genoma de referencia y reporta las posiciones donde existan discrepancias o *mismatches* en archivos tipo VCF (.vcf). Cada variante irá acompañada de una frecuencia alélica o *variant allele frequency* (VAF) que refleja el porcentaje en el que aparece la variante respecto al número total de lecturas de esa posición.

Los archivos FASTQ o “datos crudos” pueden ser procesados utilizando otro tipo de software comerciales externos a la plataforma Illumina o con *pipelines* propios con la participación de un especialista en análisis bioinformático que evite la pérdida de información o falsos positivos.

A modo de resumen, el flujo de análisis de datos de secuenciación masiva generados por un MiSeq se pueden dividir en análisis primario y análisis secundario y, a su vez, en cuatro operaciones principales: *base calling*, demultiplexado, alineamiento de lecturas frente al genoma de referencia y *variant calling*, que reportan los archivos FASTQ, BAM y VCF, respectivamente.²⁸

4. Anotación, filtrado e interpretación de variantes por parte del usuario:

El archivo VCF reportado como resultado del *variant calling* contiene información de la localización cromosómica de cada *mismatch*, su naturaleza y otras características básicas del alineamiento. En cada uno de estos ficheros aparecerá por tanto un gran número de variantes con y sin significado clínico, es decir, todo aquello que el *software* identifica diferente de la referencia. Por tanto, a partir de estos archivos se debe determinar qué variantes son realmente importantes y relevantes en la patología que se está estudiando, para lo que se usan bases de datos que aportan información a estas variantes mediante un proceso denominado anotación. Este proceso comprende por un lado la identificación de la consecuencia de la variante, es decir, si una variante provoca un cambio aminoacídico en la proteína que codifica utilizando bases de datos como UCSC,

ENSEMBL, o RefSeq y, por otro lado, su comparación con bases de datos con información ya documentada de la variante (*ClinVar*, *dbSNP*, entre otras), su frecuencia en la población (*ExAc*, *1000 Genome Project...*), e incluso, bases que asignan puntuaciones respecto a la predicción de su patogenicidad (*SIFT*, *PolyPhen...*).

A continuación, es recomendable llevar a cabo un proceso de filtrado de variantes por parte del usuario en función de una serie de criterios propios o acordados por el grupo según las prioridades y objetivos con que se haya llevado a cabo la secuenciación. El filtrado de variantes se realizará por un lado en función de los datos obtenidos de la anotación de variantes, seleccionando unos mínimos en cuanto a frecuencia poblacional, consecuencias de la variante, o categorización clínica, y por otro en función de parámetros de calidad como son el número de lecturas mínimas, la VAF o la calidad con la que se asigna el genotipo (*GQX*, *minimum genotype quality*).

La interpretación de las variantes identificadas en cada muestra se realizará utilizando las bases de datos de variantes somáticas (*COSMIC*, *IARC TP53*, *ENSEMBL*, *ClinVar*) que permitan conocer su recurrencia en cada patología, teniendo en cuenta la patología que se está estudiando. Es importante tener en cuenta la bibliografía actualizada para poder categorizar las variantes u otras bases de datos propias con resultados de otros grupos o de ensayos clínicos en la misma patología.

▪ **Parámetros de calidad y secuenciación**

Una vez finalizada la carrera de secuenciación es importante comprobar su calidad en la plataforma Illumina, ya que esta proporciona una serie de datos y gráficos que permiten evaluar distintos parámetros de la secuenciación. Por tanto, es importante tener en cuenta lo siguiente:

- **Rendimiento** (*yield*): cantidad de información generada durante el proceso de secuenciación en Gb, directamente relacionada con el tipo de secuenciador y tipo de kit de secuenciación utilizado. El MiSeq presenta un rendimiento máximo de 15 Gb.
- **Densidad de clusters**: número de *clusters* generados por mm². Este parámetro es dependiente tanto de la cantidad de ADN introducido en el cartucho como de la plataforma y kit utilizado para la secuenciación, pudiendo no tener una densidad correcta por exceso (saturación de *clusters* u *overclustering*) o por defecto (deficiencia de *clusters* o *underclustering*) de *clusters*. La densidad correcta del MiSeq utilizando los cartuchos de máxima capacidad oscila entre 1000-1200 *kcluster/mm*².
- **Cluster passing filter (CPF)**: porcentaje de *clusters* que, durante los primeros 25 ciclos de secuenciación, superan los filtros de calidad internos de la plataforma, principalmente en base a un parámetro conocido como *chastity* (ratio de la intensidad de la base con mayor fluorescencia dividida

entre la suma de esta base y la segunda más brillante). Como resultado, los *clusters* menos fiables serán eliminados del proceso de extracción de imágenes.

- **Número de bases en cada nivel de calidad** (*Q score/Phred score*): el *Q score* refleja la probabilidad de error con que una base se ha asignado a una posición, en función de una escala basada en el algoritmo *Phred*. De forma general se emplea el valor de calidad Q30 que indica la probabilidad de que una base de cada 1000 asignadas sea incorrecta.
- **Indexing QC**: número de lecturas generadas por cada muestra multiplexada. Este valor permite detectar problemas en la secuenciación de muestras concretas.

Además de la calidad, hay una serie de parámetros de secuenciación principales que se deben tener en cuenta a la hora de valorar los resultados obtenidos. Estos parámetros son los siguientes:

- **Profundidad de cobertura**: número de lecturas alineadas realizadas en una posición determinada. Cuanto más alto sea el valor de la profundidad de cobertura, mayor será la sensibilidad y confianza en la identificación de una variante. Podemos hablar de **profundidad de cobertura mínima** de una región, es decir, el mínimo de lecturas para dar cómo válida una variante en una posición; y **profundidad de cobertura media**, definida como el valor medio de lecturas de las regiones secuenciadas.
- **Porcentaje de lecturas mapeadas (porcentaje *on-target*)**: número de lecturas mapeadas en las regiones de interés respecto al número de lecturas mapeadas totales. Este parámetro es equivalente al enriquecimiento o *enrichment* conseguido de las regiones de interés, y es dependiente del diseño del panel y del tipo de estrategia utilizada, siendo por encima del 90% en paneles de amplicones, mientras que será superior al 70% en paneles de captura.
- **Uniformidad de cobertura**: definido como el porcentaje de bases diana en que la profundidad de lectura es mayor que 0.2 veces la media de la profundidad de cobertura de la región diana. Este parámetro permite comprobar que todas las regiones de interés que comprende el panel presentan un número de lecturas homogéneo. Esto no resulta fácil debido a la presencia de regiones en el genoma con alto contenido en GC o con secuencias repetitivas que son difíciles de cubrir.

Recientemente se ha publicado la primera versión de una guía que recoge recomendaciones para el manejo de la secuenciación masiva en oncohematología ("*Guidelines for Validation of NGS-Based Oncology Panels*") debido a la aplicación de esta tecnología en la práctica clínica en varias patologías.¹⁸

2.7.2. Estudios de NGS realizados: *Amplicones*

▪ Pacientes incluidos

Se llevó a cabo la técnica de secuenciación masiva mediante tecnología de amplicones en un total de 32 muestras correspondientes a 27 pacientes incluidos en los capítulos 2 y 3, además de 4 controles sanos jóvenes con el objetivo de eliminar los falsos positivos como consecuencia de errores de la técnica.

▪ Descripción del panel

Se diseñó un panel personalizado o panel *custom* basado en la tecnología de amplicones (*TruSeq Custom Amplicon v1.5*, Illumina Inc.) para la detección de mutaciones somáticas, utilizando la plataforma online *DesignStudio* (Illumina Inc.). Tras una revisión bibliográfica en profundidad, se incluyó la secuencia codificante (CDS) de 56 genes (Tabla 2) cuyas alteraciones se han visto potencialmente involucradas en el desarrollo y/o patogénesis del LNH, principalmente en LF, LDCBG y Lf, utilizando un total de 1059 amplicones para cubrir todas las regiones. Algunos de estos genes se encuentran recurrentemente mutados en dichas patologías, mientras que otros son genes poco explorados incluidos con el fin de evaluar su papel en la patogénesis principalmente del LF. La versión del genoma utilizada fue GRCh37/hg19.

Tabla 2. Descripción de los 56 genes y el número de CDS de cada uno incluidos en el diseño del panel custom de amplicones TruSeq Custom Amplicon v1.5 (Illumina Inc.).

GEN	CDS	GEN	CDS	GEN	CDS	GEN	CDS	GEN	CDS	GEN	CDS
ARID1A	20	CDKN2A	3	GNA13	4	MCL1	3	PIM1	6	TCF3	18
B2M	3	CDKN2B	2	GNAI2	8	MEF2B	7	POU2F2	14	TMSB4X	2
BCL2	2	CREBBP	31	HIST1H1B	1	MLL2	54	PRDM1	7	TNFAIP3	8
BCL6	8	CXCR4	1	HIST1H1C	1	MYC	3	RHOA	4	TNFRSF14	8
BRAF	18	DTX1	9	HIST1H1D	1	MYD88	5	RPS15	3	TP53	10
CARD11	24	EBF1	16	HIST1H1E	1	NOTCH1	34	RRAGC	7	XPO1	24
CCND3	5	EP300	31	ID3	2	NOTCH2	34	S1PR2	1		
CD70	3	EZH2	19	IRF8	8	NRAS	4	SMARCA4	35		
CD79A	5	FBXO11	23	KRAS	4	P2RY8	1	SPEN	15		
CD79B	6	FOXO1	2	MAML1	5	PAX5	10	TBL1XR1	14		

▪ Preparación de librerías

La preparación de librerías se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del protocolo *TruSeq Custom Amplicon Reference Guide* (versión 1.5) de Illumina. Para ello, se emplearon 250 ng de ADN de partida a una

concentración de 25 ng/μl cuantificada con el kit Qubit dsDNA BR (Invitrogen TM). El protocolo empleado se esquematiza en la figura 9 y se resume en 3 pasos a continuación:

1. Generación de librerías:

El primer paso consistió en diluir todas las muestras para dejarlas a una concentración de 25 ng/μl. A continuación, se llevó a cabo la hibridación de los *primers* específicos, que flanquean las regiones diana del diseño, mediante un descenso gradual de temperatura (de 95 °C a 40 °C) en un termociclador a partir de 10 μl de muestra (250 ng). Una vez finalizado el proceso de hibridación, se realizó una serie de lavados y la extensión-ligación de los *primers* por una enzima ADN ligasa, resultando en la síntesis de los amplicones. Estos fueron amplificados mediante 23 ciclos de PCR, añadiendo a sus extremos una construcción que incluye los índices correspondientes para identificar cada muestra y los adaptadores compatibles con la plataforma de secuenciación. Para verificar que se obtuvo producto en todos los casos, se testaron en un gel de agarosa al 2% comprobando que los amplicones mostraban un tamaño de 250 pb. Por último, el producto de la amplificación fue purificado utilizando Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, Inc., Indianapolis, USA) según las indicaciones del fabricante, obteniendo las librerías preparadas para su secuenciación.

2. Cuantificación y normalización:

Las librerías fueron cuantificadas con el kit Qubit dsDNA BR (Invitrogen TM) y normalizadas para convertir a nM las concentraciones obtenidas del Qubit en ng/μl, según la siguiente fórmula:

$$nM = \frac{[ng/\mu l] * 10^6}{656,6 \text{ g/mol} * 350 \text{ pb}}$$

Tamaño amplicón
(con index incluidos)

3. Multiplexado de librerías (pool):

Una vez normalizadas, las librerías fueron diluidas a 4 nM y multiplexadas en igual volumen en un único *pool*, multiplexando un total de 8 muestras en cada carrera que se llevó a cabo. Posteriormente, se desnaturalizaron las hebras del ADN utilizando NaOH a una concentración de 0.2 M, de forma que el ADN se introduzca en el secuenciador como hebra simple y pueda unirse a los oligonucleótidos de la flow cell.

▪ Secuenciación en la plataforma MiSeq (Illumina)

La secuenciación se llevó a cabo en la plataforma MiSeq de Illumina, utilizando el kit de reactivos MiSeq v3 que permite leer hasta 2x300 pb. La muestra se cargó en el cartucho de secuenciación a una concentración final de 14 pM, ya que fue la concentración con la que se obtuvo una densidad óptima de clusters. La secuenciación se realizó por ambos extremos (paired-end) con una longitud de lectura de 2x201 pb, detallando los parámetros de secuenciación, así como los códigos e índices de cada muestra en la *SampleSheet*

correspondiente diseñada con el software Illumina Experiment Manager (Illumina Inc.). Además, se incorporó en el secuenciador el archivo *Manifest* con las coordenadas de las regiones de interés correspondientes a este panel.

Se tuvieron en cuenta todos los parámetros de calidad descritos en el apartado 2.7.1, principalmente se tuvo en cuenta la profundidad de cobertura, la densidad de clusters, y el porcentaje de lecturas que superan el valor Q30 de acuerdo al algoritmo Phred.

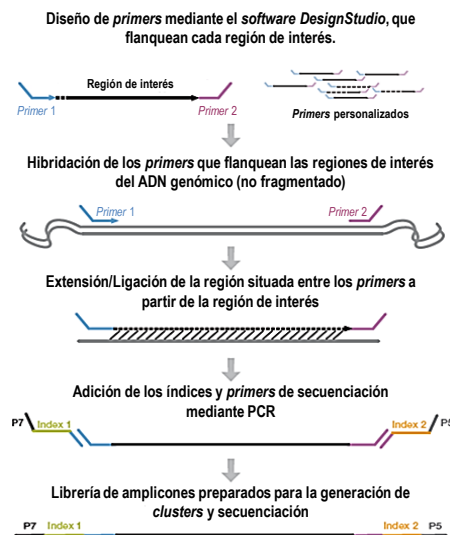


Figura 9. Esquema donde se representan los pasos a seguir en la preparación de librerías mediante la tecnología de amplicones TruSeq Custom Amplicon (Illumina Inc.)

2.7.3. Estudios de NGS realizados: *Captura*

▪ Pacientes incluidos

Se llevó a cabo la técnica de secuenciación masiva mediante tecnología de captura en un total de 161 muestras correspondientes a 87 pacientes incluidos en los capítulos 2 y 3, además de 5 muestras secuenciadas en paralelo, y por tanto por duplicado, utilizando ambas tecnologías con el objetivo de verificar que son comparables.

▪ Descripción del panel

Se llevó a cabo un diseño personalizado para la detección de mutaciones somáticas basado en tecnología de captura, utilizando la química Roche NimbleGen (*SeqCap EZ Choice Enrichment*, Roche NimbleGen Inc., Madison, WI), a partir del diseño de amplicones descrito previamente (apartado 2.7.2). El diseño se desarrolló utilizando la plataforma *NimbleDesign* (Roche NimbleGen Inc.), incluyendo la CDS de un total de

66 genes, conservando los 56 genes presentes en el diseño previo de amplicones y añadiendo 10 genes nuevos recientemente descritos en LF y LFt (Tabla 3). Este diseño además incluye sondas que mapean las regiones 3' UTR (*untranslated region*) de los genes *NOTCH1* y *TP53*, y una secuencia descrita en la literatura como *enhancer* del gen *PAX5*. El tamaño final del diseño fue 161.368 kb, utilizando un total de 727 sondas para cubrir todas las regiones de interés. La versión del genoma utilizada fue GRCh37/hg19.

Tabla 3. Descripción de los 66 genes, el número de CDS de cada uno de ellos, y las regiones no codificantes incluidas en el diseño del panel custom de captura SeqCap EZ Choice Enrichment (Roche NimbleGen Inc.).

GEN	CDS	GEN	CDS	GEN	CDS	GEN	CDS	GEN	CDS	GEN	CDS
<i>ARID1A</i>	20	<i>CDKN2B</i>	2	<i>GNAI2</i>	8	<i>MLL2</i>	54	<i>RHOA</i>	4	<i>TMEM30A*</i>	7
<i>B2M</i>	3	<i>CIITA*</i>	19	<i>HIST1H1B</i>	1	<i>MYC</i>	3	<i>RPS15</i>	3	<i>TMSB4X</i>	2
<i>BCL2</i>	2	<i>CREBBP</i>	31	<i>HIST1H1C</i>	1	<i>MYD88</i>	5	<i>RRAGC</i>	7	<i>TNFAIP3</i>	8
<i>BCL6</i>	8	<i>CXCR4</i>	1	<i>HIST1H1D</i>	1	<i>NOTCH1</i>	34	<i>S1PR2</i>	1	<i>TNFRSF14</i>	8
<i>BRAF</i>	18	<i>DTX1</i>	9	<i>HIST1H1E</i>	1	<i>NOTCH2</i>	34	<i>SGK1*</i>	14	<i>TP53</i>	10
<i>CARD11</i>	24	<i>EBF1</i>	16	<i>ID3</i>	2	<i>NRAS</i>	4	<i>SMARCA4</i>	35	<i>XPO1</i>	24
<i>CCND3</i>	5	<i>EP300</i>	31	<i>IRF8</i>	8	<i>P2RY8</i>	1	<i>SOCS1*</i>	1		
<i>CD58*</i>	5	<i>EZH2</i>	19	<i>KLHL6*</i>	7	<i>PAX5</i>	10	<i>SPEN</i>	15		
<i>CD70</i>	3	<i>FAS*</i>	9	<i>KRAS</i>	4	<i>PDL1*</i>	6	<i>STAT3*</i>	23	3' UTR - <i>NOTCH1</i> 3' UTR - <i>TP53</i> <i>Enhancer</i> - <i>PAX5</i>	
<i>CD79A</i>	5	<i>FBXO11</i>	23	<i>MAML1</i>	5	<i>PIM1</i>	6	<i>STAT6*</i>	21		
<i>CD79B</i>	6	<i>FOXO1</i>	2	<i>MCL1</i>	3	<i>POU2F2</i>	14	<i>TBL1XR1</i>	14		
<i>CDKN2A</i>	3	<i>GNA13</i>	4	<i>MEF2B</i>	7	<i>PRDM1</i>	7	<i>TCF3</i>	18		

En azul y señalados con un asterisco se muestran los genes y regiones nuevas, añadidas respecto al diseño anterior (Tabla 2), cuya frecuencia se estimará respecto a la serie de pacientes estudiados con la tecnología de captura, a diferencia del resto en los que se estimará sobre la serie total de pacientes secuenciados por NGS.

▪ **Preparación de librerías**

La preparación de librerías se llevó a cabo siguiendo las instrucciones de la combinación de dos protocolos, *SeqCap EZ HyperCap Library Workshop protocol using HyperPlus kit* (versión 1.0) y *NimbleGen SeqCap EZ Library Double Capture Workshop protocol* (versión 5.1), ya que se utilizó el método de doble captura según las indicaciones del fabricante en la nota técnica *Double Capture: An Alternative Protocol for Sequence Capture of Difficult Targets* (Roche NimbleGen Inc., Agosto 2012). Esta alternativa se empleó debido a que mejora tanto el porcentaje de lecturas *on-target* como el rendimiento en paneles con tamaños próximos o inferiores a 100 kb, como sería el caso del presente diseño. Para ello, se emplearon 200 ng de ADN de partida, previamente purificado (apartado 2.3.4), cuantificados con el kit Qubit dsDNA BR (Invitrogen TM). En los casos en que el ADN se encontraba fragmentado, con tamaños entre 700 y 1000 pb evaluados como se describe en el apartado 2.3.4, se emplearon 400 ng de ADN purificado de partida. El protocolo empleado se esquematiza en la figura 10 y será resumido en 5 pasos a continuación:

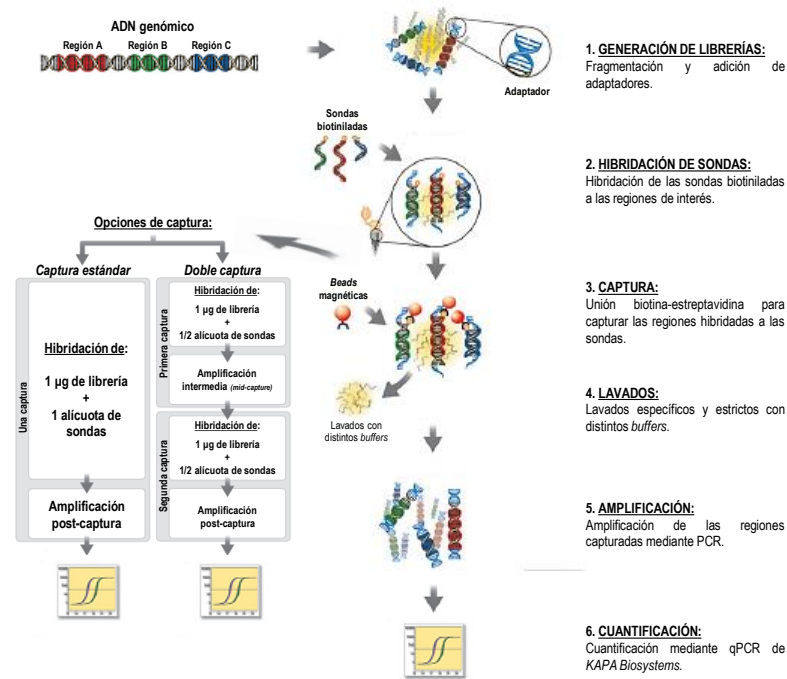


Figura 10. Esquema donde se representan los pasos a seguir en la preparación de librerías mediante la tecnología de captura SeqCap EZ Target Enrichment (Roche NimbleGen Inc.).

1. Generación de librerías y primer QC (quality control):

El primer paso consiste en la fragmentación enzimática del ADN, purificado y cuantificado, durante 20 min a 37 °C en el termociclador, consiguiendo un conjunto de fragmentos de ADN de doble cadena de tamaños homogéneos (180-220 pb). Estos fragmentos fueron sometidos a un tratamiento con enzimas de restricción durante 30 min a 65 °C, que produce extremos romos y añade una adenina (A) al extremo 3' de fragmento donde se unirán los adaptadores mediante ligación por una ADN ligasa durante 15 min a 20 °C. El producto de la reacción, una vez purificado con Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, Inc.) según las indicaciones del fabricante, será sometido a un proceso de selección de tamaños (*double-sided size selection*) utilizando diferentes ratios ADN:AMPure XP, obteniendo librerías con tamaños entre 250-450 pb que serán amplificadas mediante 6 ciclos de PCR y purificadas utilizando Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, Inc.). El perfil de tamaños de cada una de las librerías será evaluado con el ensayo Agilent D1000 Assay en el equipo 4200 TapeStation System (Agilent Technologies) y su concentración cuantificada con el kit Qubit dsDNA HS (Invitrogen TM).

2. Multiplexado de librerías (pool) y primera hibridación:

En todos los casos se llevó a cabo un proceso de multiplexado o *multiplexing* de 12 librerías procedentes del paso 1, correctamente identificadas, en un pool equimolar de 1 µg. Este *pool*, una vez liofilizado y desnaturalizado, se sometió a un proceso de hibridación a 47 °C de 16 a 20 h con 2.25 µl de sondas biotiniladas complementarias a las regiones de interés que se quieren capturar (primera hibridación).

3. Primera captura y segunda hibridación:

Los fragmentos de ADN hibridados a las sondas biotiniladas fueron sometidos a un proceso de captura durante 45 min a 47 °C a través de bolas magnéticas recubiertas de estreptavidina que, debido a la elevada afinidad biotina-estreptavidina, permitirán la unión exclusiva de estas sondas (primera captura). A continuación, los fragmentos unidos a las bolas magnéticas fueron sometidos a una serie de lavados estrictos y específicos con distintos *buffers* que conllevan la eliminación tanto de los fragmentos no hibridados, como de las sales y restos de reactivos. Una vez finalizados los lavados, el pool fue amplificado mediante 5 ciclos de PCR, purificado utilizando Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, Inc.) y de nuevo sometido a un proceso de hibridación a 47 °C de 16 a 20 h con 2.25 µl de sondas biotiniladas (segunda hibridación).

4. Segunda captura y segundo QC:

Una vez finalizada la segunda hibridación, se llevó a cabo la segunda captura durante 45 min a 47 °C, seguida de los lavados con los diferentes *buffers* de igual forma que en el paso 3. A continuación, se llevó a cabo la amplificación mediante 14 ciclos de PCR y purificación con Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, Inc.), obteniendo el pool final cuyo perfil de tamaños será evaluado con el ensayo Agilent D1000 High Sensitivity Assay en el equipo 4200 TapeStation System (Agilent Technologies), esperando tamaños entre 250-500 pb.

5. Cuantificación con KAPA Library Quantification Kit y normalización:

La cuantificación del pool enriquecido con las regiones de interés se llevó a cabo mediante qPCR utilizando el kit comercial KAPA Library Quantification Kit (KAPA Biosystems, Roche NimbleGen Inc.), siguiendo las indicaciones del fabricante (*KAPA Library Quantification Kit Illumina Platforms KR0405 – v8.17*, Enero 2017) tal y como se resume en el anexo II. Este método permitió cuantificar únicamente los fragmentos de ADN indexados con las secuencias P5 y P7 compatibles con la plataforma MiSeq de Illumina, que serán los fragmentos candidatos a ser secuenciados. Además, esta técnica de cuantificación hizo posible la obtención de la curva de disociación o *Melt curve* que permiten detectar la presencia de dímeros de adaptadores, en caso de que existan, que interferirán con la secuenciación (anexo II). Una vez cuantificado y hecha la conversión a nM, el pool final fue diluido a 4 nM y, posteriormente, se desnaturalizaron sus hebras utilizando NaOH a una concentración de 0.2 M, de forma que el ADN se introduzca en el secuenciador como hebra simple y pueda unirse a los oligonucleótidos de la *flow cell*.

▪ **Secuenciación en la plataforma MiSeq (Illumina)**

La secuenciación se llevó a cabo en la plataforma MiSeq de Illumina, utilizando el kit de reactivos MiSeq v3 que permite leer hasta 2x300 pb, cargando la muestra en el cartucho de secuenciación a una concentración final de 16 pM, ya que fue con la que se obtuvo una densidad óptima de *clusters*. La secuenciación se realizó por

ambos extremos (*paired-end*) con una longitud de lectura de 2x101 pb, detallando los parámetros de secuenciación y los códigos e índices de cada muestra en la *SampleSheet* diseñada con el software Illumina Experiment Manager (Illumina Inc.). Además, se incorporó en el secuenciador el archivo *Manifest* con las coordenadas de las regiones de interés correspondientes a este panel. Se tuvieron en cuenta todos los parámetros de calidad y secuenciación descritos en el apartado 2.7.1, principalmente se tuvo en cuenta la profundidad de cobertura, la densidad de *clusters*, el porcentaje de lecturas *on-target*, equivalente al enriquecimiento o *enrichment* conseguido en la carrera, y el porcentaje de lecturas que superan el valor Q30 de acuerdo al algoritmo *Phred*.

2.7.4. Anotación, filtrado e interpretación de variantes

La generación de datos se llevó a cabo utilizando el *software* MiSeq Reporter (MSR) tal y como se describió en el apartado 2.7.1, obteniendo a partir de los FASTQ tanto los archivos alineados BAM, como los archivos VCF que contienen las variantes respecto al genoma de referencia. Este procesamiento de datos se realizó tanto en las carreras correspondientes al panel de amplicones, como a las realizadas con la estrategia de captura. Los archivos VCF se analizaron con el *software* *BaseSpace Variant Interpreter* (Illumina Inc.) que permitió llevar a cabo la anotación y filtrado de las variantes, y exportar los resultados del análisis en formato Excel. El visor de secuencias *Integrative Genomics Viewer* (IGV, *Broad Institute and the Regents of the University of California, USA*) se utilizó para confirmar las variantes observadas y verificar su fiabilidad tras el proceso de anotación y filtrado. Además, el *software* IGV permitió detectar falsos positivos, así como observar la cobertura del diseño, es decir, detectar qué regiones del diseño son más pobres en lecturas y se deben ajustar en futuros diseños.^{29;30}

Tras importar y anotar las variantes obtenidas tras el alineamiento de las lecturas resultantes de la secuenciación, tanto por amplicones como por captura, en el *BaseSpace Variant Interpreter* (Illumina Inc.), se aplicaron los siguientes filtros:

- Consecuencia:** se tuvieron en cuenta todas las variantes que suponen un cambio o consecuencia en la proteína, es decir, variantes que afectan al codón de terminación o codón de *stop* y/o a la región de *splicing*, indels sin cambio en el marco de lectura o *inframe* que suponen la pérdida o adición de aminoácidos (indels de 3 o múltiplos de 3 nucleótidos), indels con cambio en el marco de lectura o *frameshift* que cambian el aminoácido en esa posición (indels de un número de nucleótidos no múltiplo de 3), variantes de cambio de sentido o *missense* (variantes que producen un cambio de aminoácido) y variantes sin sentido o *nonsense* (variante que produce un codón de *stop*). Por tanto,

para los estudios de los capítulos 2 y 3 de la presente tesis doctoral se descartaron las variantes silenciosas o sin consecuencia proteica (sinónimas, intrónicas, en región UTR, etc.).

- ☑ **Frecuencia en la población:** se consideraron las variantes presentes en la población en una frecuencia igual o inferior al 1%, descartando por tanto los polimorfismos o *single-nucleotide polymorphism* (SNP), según las bases de datos *Exome Aggregation Consortium* (ExAC), *1000 Genomes Project*, *Exome Variant Server* (EVS) y dbSNP (NCBI).
- ☑ **Métricas o calidad:** se consideraron las variantes en lecturas que superaron los filtros de calidad de la secuenciación clasificadas como *PASS* por la plataforma Illumina, que además presentan un valor de GQX superior a 60, un número total de lecturas o profundidad de cobertura por encima de 100X (variantes en posiciones leídas un mínimo de 100 veces) y una frecuencia de la variante alterada o VAF igual o mayor que 5%.

Para la interpretación de las variantes se contrastaron diferentes bases de datos de variantes somáticas que permitieron conocer el interés clínico-biológico de la información obtenida de la secuenciación, además de la bibliografía publicada en el ámbito de estudio. Las bases de datos más utilizadas para el análisis de mutaciones somáticas fueron las siguientes:

- **COSMIC** (Catálogo de mutaciones somáticas en cáncer): base de datos pública que contiene información de variantes clasificadas como mutaciones somáticas adquiridas involucradas en cáncer. La información recogida en esta base de datos procede principalmente de bibliografía relacionada con genes involucrados en procesos oncológicos y de los estudios de secuenciación del genoma completo desarrollados por el *Cancer Genome Project* (Sanger Institute, UK).³¹
- **ENSEMBL**: base de datos con múltiples datos y herramientas que proporcionan información sin restricciones y permite contrastar variantes, su efecto fenotípico, su localización y contexto genético, bibliografía relacionada, etc. además de estar vinculada a otras bases de datos como por ejemplo COSMIC.^{32,33}
- **Atlas of genetics and cytogenetics in oncology and haematology**: herramienta utilizada como base de datos y enciclopedia centrada en genes implicados en cáncer, que combina multitud de información relativa a anomalías genéticas, histopatología y diagnóstico clínico, además de enlaces externos a bibliografía y otras bases de datos.³⁴
- **ExAc** (*Exome Aggregation Consortium*): base de datos pública que integra información de la secuenciación del exoma completo de más de 60000 individuos no emparentados, cuya secuenciación se realizó como parte de varios proyectos de secuenciación, obteniendo gran variedad de datos poblacionales de variación genética.³⁵

- **EVS** (*Exome Variant Server*): base de datos generados a partir de información de la secuenciación de miles de exomas, que reporta frecuencias poblacionales e información de variantes somáticas como parte del proyecto NHLBI Exome Sequencing Project (ESP).³⁶
- **dbSNP**: base de datos que forma parte del *The National Center for Biotechnology Information (NCBI)* e incluye información validada sobre múltiples polimorfismos de un solo nucleótido de referencia humana (*RefSNP*) descritos por su posición genómica. Esta base de datos comprende tanto variantes raras causantes de enfermedades como variantes comunes y benignas, integrando información de otras bases del NCBI como puede ser *PubMed* o *ClinVar*.³⁷
- **ClinVar**: base de datos creada en 2012 que forma parte del *NCBI*, que se utiliza para predecir los efectos de las variantes en base a cinco categorías que las clasifican desde benignas a patógenas, además de categorías adicionales relacionadas con farmacogenómica, y proporciona enlaces e información de bases externas.³⁶

2.7.5. Comparación de ambas tecnologías: amplicones vs captura

Con el fin de verificar que ambos diseños y tecnologías eran comparables, se realizó la secuenciación masiva en paralelo por ambas tecnologías, amplicones y captura, de cinco muestras de ADN extraído de biopsias de adenopatías, correspondientes a tres pacientes con LF y dos con LDCBG, como se detalló en el apartado 2.3.1, llevando a cabo el proceso de generación de librerías (apartados 2.7.2 y 2.7.3) y aplicando los parámetros de secuenciación correspondientes en cada caso. Esta comparación se realizó con el objetivo de justificar el cambio de estrategia, valorar la concordancia de ambas estrategias y unificar los datos obtenidos por ambas tecnologías, llevando a cabo el análisis conjunto de los mismos exclusivamente en lo referente a las regiones compartidas por ambos diseños.

3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO Y DEFINICIÓN DE VARIABLES

Las pruebas estadísticas y curvas de supervivencia se llevaron a cabo utilizando el paquete informático SPSS 23.0 (IBM SPSS 23.0, IBM Corp, Armonk, NY, USA). Las posibles asociaciones entre variables fueron analizadas utilizando la prueba *chi cuadrado* (χ^2) para variables categóricas, y la prueba *t de Student* o *U de Mann-Whitney* para variables continuas. La supervivencia fue estimada empleando el método *Kaplan-Meier* y las diferencias fueron evaluadas mediante el test *log-rank*. Posteriormente, todas las variables biológicas para las que hubo algún indicio de una asociación significativa con las características clínicas analizadas en el análisis univariante ($P < 0.1$) o que en estudios previos hubiese sido demostrado su valor pronóstico, se consideraron en un modelo de regresión multivariante de Cox (método introducir). Para estimar el peso de una variable en este análisis se calcularon las *hazard ratio* (HR) con un intervalo de confianza del 95%. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas para valores de $P < 0.05$.

Las comparaciones múltiples entre subgrupos y genes IGHV del capítulo 1 se llevaron a cabo con la modalidad *two-sided* del test de Fisher, utilizando el paquete informático GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software, San Diego, CA). En estas comparaciones, los *P*-valor fueron corregidos mediante la corrección de *Bonferroni* (P_c) con el fin de evitar hallazgos casuales y asumir la probabilidad de error.³⁸

Se exploraron las siguientes variables clínicas o *clinical endpoints* en los distintos capítulos comprendidos en la presente tesis doctoral:

- (i) **respuesta al tratamiento de inducción** de acuerdo a los criterios del *International Working Group*, basada en TC o PET/TC;²⁻⁴
- (ii) **tasa de respuesta completa a los 30 meses (CR30)**, por su siglas en inglés), definida como respuesta completa a los 30 meses desde la fecha de inicio del tratamiento de inducción evaluada por TC o PET/TC;³⁹
- (iii) **supervivencia libre de fracaso terapéutico (SLFT)**, definida como menos que una respuesta parcial al final del tratamiento de inducción, recaída, progresión o muerte;⁴⁰
- (iv) **tiempo hasta la transformación (TTT)**, por sus siglas en inglés), medido como el tiempo desde la fecha del diagnóstico como LF hasta la fecha de transformación histológica a linfoma agresivo (LFt),⁴¹ definida únicamente en base a criterios patológicos;
- (v) **transformación histológica a 10 años (TH a 10 años)**, definida como la probabilidad de que se haya producido una TH en cualquier momento dentro de un periodo de tiempo dado de 10 años; y
- (vi) **supervivencia global (SG)**, que hace referencia al tiempo transcurrido entre la fecha del diagnóstico de LF y la fecha de muerte por cualquier causa.

4. BIBLIOGRAFÍA

1. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Revised 4th Edition.: IARC Press; 2017.
2. Cheson BD, Horning SJ, Coiffier B et al. Report of an international workshop to standardize response criteria for non-Hodgkin's lymphomas. NCI Sponsored International Working Group. *J.Clin.Oncol.* 1999;17:1244.
3. Cheson BD, Pfistner B, Juweid ME et al. Revised response criteria for malignant lymphoma. *J.Clin.Oncol.* 2007;25:579-586.
4. Cheson BD, Fisher RI, Barrington SF et al. Recommendations for initial evaluation, staging, and response assessment of Hodgkin and non-Hodgkin lymphoma: the Lugano classification. *J.Clin.Oncol.* 2014;32:3059-3068.
5. 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.
6. Green MR, Sambrook J. Isolation of High-Molecular-Weight DNA Using Organic Solvents. *Cold Spring Harb.Protoc.* 2017;2017:db.
7. Chomczynski P, Mackey K, Drews R, Wilfinger W. DNAzol: a reagent for the rapid isolation of genomic DNA. *Biotechniques* 1997;22:550-553.
8. Lorenz TC. Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *J.Vis.Exp.* 2012e3998.
9. Van Dongen JJ, Langerak AW, Bruggemann M et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia* 2003;17:2257-2317.
10. Sahota SS, Leo R, Hamblin TJ, Stevenson FK. Ig VH gene mutational patterns indicate different tumor cell status in human myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood* 1996;87:746-755.
11. Ghia P, Stamatopoulos K, Belessi C et al. ERIC recommendations on IGHV gene mutational status analysis in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2007;21:1-3.
12. Gribben JG, Freedman A, Woo SD et al. All advanced stage non-Hodgkin's lymphomas with a polymerase chain reaction amplifiable breakpoint of bcl-2 have residual cells containing the bcl-2 rearrangement at evaluation and after treatment. *Blood* 1991;78:3275-3280.
13. Xu J, Yan LX, Zhang KP et al. [Detection and application of bcl-2/IgH gene translocation and immunoglobulin gene rearrangement in follicular lymphoma]. *Zhonghua Bing.Li Xue.Za Zhi.* 2018;47:423-426.
14. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1977;74:5463-5467.
15. Smith LM, Sanders JZ, Kaiser RJ et al. Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature* 1986;321:674-679.
16. Giudicelli V, Chaume D, Lefranc MP. IMGT/V-QUEST, an integrated software program for immunoglobulin and T cell receptor V-J and V-D-J rearrangement analysis. *Nucleic Acids Res.* 2004;32:W435-W440.
17. Kozarewa I, Armisen J, Gardner AF, Slatko BE, Hendrickson CL. Overview of Target Enrichment Strategies. *Curr.Protoc.Mol.Biol.* 2015;112:7-23.
18. Jennings LJ, Arcila ME, Corless C et al. Guidelines for Validation of Next-Generation Sequencing-Based Oncology Panels: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology and College of American Pathologists. *J.Mol.Diagn.* 2017;19:341-365.
19. Mamanova L, Coffey AJ, Scott CE et al. Target-enrichment strategies for next-generation sequencing. *Nat.Methods* 2010;7:111-118

20. Mardis ER. Next-generation sequencing platforms. *Annu.Rev.Anal.Chem.(Palo.Alto.Calif.)* 2013;6:287-303.
21. Loman NJ, Misra RV, Dallman TJ et al. Performance comparison of benchtop high-throughput sequencing platforms. *Nat.Biotechnol.* 2012;30:434-439.
22. Quail MA, Smith M, Coupland P et al. A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. *BMC.Genomics* 2012;13:341.
23. Chen S, Li S, Xie W et al. Performance comparison between rapid sequencing platforms for ultra-low coverage sequencing strategy. *PLoS.One.* 2014;9:e92192.
24. Bentley DR, Balasubramanian S, Swerdlow HP et al. Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature* 2008;456:53-59.
25. Minoche AE, Dohm JC, Himmelbauer H. Evaluation of genomic high-throughput sequencing data generated on Illumina HiSeq and genome analyzer systems. *Genome Biol.* 2011;12:R112.
26. Dohm JC, Lottaz C, Borodina T, Himmelbauer H. Substantial biases in ultra-short read data sets from high-throughput DNA sequencing. *Nucleic Acids Res.* 2008;36:e105.
27. Metzker ML. Sequencing technologies - the next generation. *Nat.Rev.Genet.* 2010;11:31-46.
28. Gargis AS, Kalman L, Bick DP et al. Good laboratory practice for clinical next-generation sequencing informatics pipelines. *Nat.Biotechnol.* 2015;33:689-693.
29. Robinson JT, Thorvaldsdottir H, Winckler W et al. Integrative genomics viewer. *Nat.Biotechnol.* 2011;29:24-26.
30. Thorvaldsdottir H, Robinson JT, Mesirov JP. Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. *Brief.Bioinform.* 2013;14:178-192.
31. Forbes SA, Tang G, Bindal N et al. COSMIC (the Catalogue of Somatic Mutations in Cancer): a resource to investigate acquired mutations in human cancer. *Nucleic Acids Res.* 2010;38:D652-D657.
32. Hunt SE, McLaren W, Gil L et al. Ensembl variation resources. *Database.(Oxford)* 2018;2018:
33. Cunningham F, Achuthan P, Akanni W et al. Ensembl 2019. *Nucleic Acids Res.* 2019;47:D745-D751.
34. Huret JL, Ahmad M, Arsaban M et al. Atlas of genetics and cytogenetics in oncology and haematology in 2013. *Nucleic Acids Res.* 2013;41:D920-D924.
35. Karczewski KJ, Weisburd B, Thomas B et al. The ExAC browser: displaying reference data information from over 60 000 exomes. *Nucleic Acids Res.* 2017;45:D840-D845.
36. Johnston JJ, Biesecker LG. Databases of genomic variation and phenotypes: existing resources and future needs. *Hum.Mol.Genet.* 2013;22:R27-R31.
37. Sherry ST, Ward MH, Kholodov M et al. dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res.* 2001;29:308-311.
38. McLaughlin MJ, Sainani KL. Bonferroni, Holm, and Hochberg corrections: fun names, serious changes to p values. *PM.R.* 2014;6:544-546.
39. Shi Q, Flowers CR, Hiddemann W et al. Thirty-Month Complete Response as a Surrogate End Point in First-Line Follicular Lymphoma Therapy: An Individual Patient-Level Analysis of Multiple Randomized Trials. *J.Clin.Oncol.* 2016JCO2016708651.
40. Pastore A, Jurinovic V, Kridel R et al. Integration of gene mutations in risk prognostication for patients receiving first-line immunochemotherapy for follicular lymphoma: a retrospective analysis of a prospective clinical trial and validation in a population-based registry. *Lancet Oncol.* 2015;16:1111-1122.
41. Blaker YN, Spetalen S, Brodtkorb M et al. The tumour microenvironment influences survival and time to transformation in follicular lymphoma in the rituximab era. *Br.J.Haematol.* 2016;175:102-114.

MATERIAL SUPLEMENTARIO - Tablas Suplementarias:

Tabla suplementaria S1. Información detallada de las regiones incluidas en el diseño de ambos paneles personalizados de secuenciación masiva (amplicones y captura), para el estudio de mutaciones somáticas. La información se obtuvo de las bases de datos *University of California Santa Cruz Genome Browser* (UCSC) y ENSEMBL, utilizando la versión del genoma GRCh37/hg19.

GEN	Cromosoma	Coordenadas genómicas (inicio)	Coordenadas genómicas (final)	Nº Exones	Región incluida	Nº CDS	Tamaño (pb)	Cadena de ADN	ID Tránsito	RefSeq
GENES / REGIONES COMUNES EN AMBOS DISEÑOS										
<i>ARID1A</i>	1	27022522	27108601	20	CDS completa	20	6858	Fw	ENST00000324856.7	NM_006015
<i>B2M</i>	15	45003685	45010357	4	CDS completa	3	360	Fw	ENST00000558401.1	NM_004048
<i>BCL2</i>	18	60790579	60986613	2	CDS completa	2	720	Rev	ENST00000398117.1	NM_000633
<i>BCL6</i>	3	187439165	187463513	10	CDS completa	8	2121	Rev	ENST00000406870.2	NM_001706
<i>BRAF</i>	7	140433813	140624564	18	CDS completa	18	2301	Rev	ENST00000288602.6	NM_004333
<i>CARD11</i>	7	2945710	3083509	25	CDS completa	24	3465	Rev	ENST00000396946.4	NM_032415
<i>CCND3</i>	6	41902671	41909552	5	CDS completa	5	879	Rev	ENST00000372991.4	NM_001760
<i>CD70</i>	19	6585850	6591163	3	CDS completa	3	582	Rev	ENST00000245903.3	NM_001252
<i>CD79A</i>	19	42381190	42385439	5	CDS completa	5	681	Fw	ENST00000221972.3	NM_001783
<i>CD79B</i>	17	62006098	62009704	6	CDS completa	6	693	Rev	ENST00000392795.3	NM_001039933
<i>CDKN2A</i>	9	21967751	21975132	4	CDS completa	3	504	Rev	ENST00000498124.1	NM_001195132
<i>CDKN2B</i>	9	22002902	22009312	2	CDS completa	2	417	Rev	ENST00000276925.6	NM_078487
<i>CREBBP</i>	16	3775056	3930121	31	CDS completa	31	7329	Rev	ENST00000262367.5	NM_004380
<i>CXCR4</i>	2	136871919	136875725	1	CDS completa	1	1071	Rev	ENST00000409817.1	NM_001008540
<i>DTX1</i>	12	113495662	113535833	9	CDS completa	9	1863	Fw	ENST00000257600.3	NM_004416
<i>EBF1</i>	5	158122923	158526788	16	CDS completa	16	1776	Rev	ENST00000313708.6	NM_024007
<i>EP300</i>	22	41488614	41576081	31	CDS completa	31	7245	Fw	ENST00000263253.7	NM_001429
<i>EZH2</i>	7	148504464	148581441	20	CDS completa	19	2256	Rev	ENST00000320356.2	NM_004456
<i>FBXO11</i>	2	48034059	48132932	23	CDS completa	23	2784	Rev	ENST00000403359.3	NM_001190274
<i>FOXO1</i>	13	41129801	41240734	3	CDS completa	2	1968	Rev	ENST00000379561.5	NM_002015
<i>GNA13</i>	17	63005407	63052920	4	CDS completa	4	1134	Rev	ENST00000439174.2	NM_006572
<i>GNAI2</i>	3	50273647	50296786	9	CDS completa	8	1068	Fw	ENST00000313601.6	NM_002070

Tabla Suplementaria S1. (Continuación)

GEN	Cromosoma	Coordenadas genómicas (inicio)	Coordenadas genómicas (final)	Nº Exones	Región incluida	Nº CDS	Tamaño (pb)	Cadena de ADN	ID Tránsito	RefSeq
<i>HIST1H1B</i>	6	27834570	27835359	1	CDS completa	1	681	Rev	ENST00000331442.3	NM_005322
<i>HIST1H1C</i>	6	26055968	26056699	1	CDS completa	1	642	Rev	ENST00000343677.2	NM_005319
<i>HIST1H1D</i>	6	26234440	26235216	1	CDS completa	1	666	Rev	ENST00000244534.5	NM_005320
<i>HIST1H1E</i>	6	26156559	26157343	1	CDS completa	1	660	Fw	ENST00000304218.3	NM_005321
<i>ID3</i>	1	23884421	23886285	3	CDS completa	2	360	Rev	ENST00000374561.5	NM_002167
<i>IRF8</i>	16	85932774	85956211	9	CDS completa	8	1281	Fw	ENST00000268638.5	NM_002163
<i>KRAS</i>	12	25358180	25403854	6	CDS completa	4	570	Rev	ENST00000256078.4	NM_033360
<i>MAML1</i>	5	179159851	179204287	5	CDS completa	5	3051	Fw	ENST00000292599.3	NM_014757
<i>MCL1</i>	1	150547027	150552214	3	CDS completa	3	1053	Rev	ENST00000369026.2	NM_021960
<i>MEF2B</i>	19	19256376	19281098	10	CDS completa	7	1098	Rev	ENST00000602424.2	NM_005919
<i>MLL2/KMT2D</i>	12	49412758	49449107	54	CDS completa	54	16614	Rev	ENST00000301067.7	NM_003482
<i>MYC</i>	8	128748315	128753680	3	CDS completa	3	1365	Fw	ENST00000377970.2	NM_002467
<i>MYD88</i>	3	38179969	38184512	5	CDS completa	5	954	Fw	ENST00000417037.2	NM_001172567
<i>NOTCH1</i>	9	139388896	139440238	34	CDS completa	34	7668	Rev	ENST00000277541.6	NM_017617
<i>NOTCH2</i>	1	120454176	120612317	34	CDS completa	34	7416	Rev	ENST00000256646.2	NM_024408
<i>NRAS</i>	1	115247085	115259515	7	CDS completa	4	570	Rev	ENST00000369535.4	NM_002524
<i>P2RY8</i>	X	1581466	1656037	2	CDS completa	1	1080	Rev	ENST00000381297.4	NM_178129
<i>PAX5</i>	9	36838531	37034476	10	CDS completa	10	1176	Rev	ENST00000358127.4	NM_016734
<i>PIM1</i>	6	37137922	37143294	6	CDS completa	6	942	Fw	ENST00000373509.5	NM_001243186
<i>POU2F2/OCT2</i>	19	42590262	42636625	14	CDS completa	14	1392	Rev	ENST00000389341.5	NM_001207025
<i>PRDM1</i>	6	106534195	106557814	7	CDS completa	7	2478	Fw	ENST00000369096.4	NM_001198
<i>RHOA</i>	3	49396579	49449526	5	CDS completa	4	582	Rev	ENST00000418115.1	NM_001664
<i>RPS15</i>	19	1438363	1440492	4	CDS completa	3	357	Fw	ENST00000233609.4	NM_001018
<i>RRAGC</i>	1	39303869	39325495	7	CDS completa	7	1200	Rev	ENST00000373001.3	NM_022157
<i>S1PR2</i>	19	10332109	10341948	2	CDS completa	1	1062	Rev	ENST00000590320.1	NM_004230
<i>SMARCA4</i>	19	11071598	11172958	36	CDS completa	35	5040	Fw	ENST00000358026.2	NM_001128849
<i>SPEN</i>	1	16174359	16266950	15	CDS completa	15	10995	Fw	ENST00000375759.3	NM_015001

Tabla Suplementaria S1. (Continuación)

GEN	Cromosoma	Coordenadas genómicas (inicio)	Coordenadas genómicas (final)	Nº Exones	Región incluida	Nº CDS	Tamaño (pb)	Cadena de ADN	ID Tránsito	RefSeq
<i>TBL1XR1</i>	3	176738542	176915048	16	CDS completa	14	1545	Rev	ENST00000457928.2	NM_024665
<i>TCF3</i>	19	1609289	1650286	19	CDS completa	18	1965	Rev	ENST00000262965.5	NM_003200
<i>TMSB4X</i>	X	12993226	12995346	3	CDS completa	2	135	Fw	ENST00000451311.2	NM_021109
<i>TNFAIP3</i>	6	138188325	138204451	9	CDS completa	8	2373	Fw	ENST00000237289.4	NM_006290
<i>TNFRSF14</i>	1	2487805	2495267	8	CDS completa	8	852	Fw	ENST00000355716.4	NM_003820
<i>TP53</i>	17	7571720	7590868	11	CDS completa	10	1182	Rev	ENST00000269305.4	NM_000546
<i>XPO1</i>	2	61705069	61765418	25	CDS completa	24	3216	Rev	ENST00000401558.2	NM_003400
GENES / REGIONES EXCLUSIVAS DEL DISEÑO DE CAPTURA										
<i>CD58</i>	1	117057156	117113715	5	CDS completa	5	747	Rev	ENST00000457047.2	NM_001144822
<i>CIITA</i>	16	10971055	11018840	20	CDS completa	19	3393	Fw	ENST00000324288.8	NM_001286402
<i>FAS</i>	10	90750288	90775542	9	CDS completa	9	1008	Fw	ENST00000355740.2	NM_000043
<i>KLHL6</i>	3	183205319	183273499	7	CDS completa	7	1866	Rev	ENST00000341319.3	NM_130446
<i>PDL1/CD274</i>	9	5450503	5470567	7	CDS completa	6	873	Fw	ENST00000381577.3	NM_014143
<i>SGK1</i>	6	134490384	134639196	14	CDS completa	14	1581	Rev	ENST00000367858.5	NM_001143676
<i>SOCS1</i>	16	11348274	11350039	2	CDS completa	1	636	Rev	ENST00000332029.2	NM_003745
<i>STAT3</i>	17	40465343	40540513	24	CDS completa	23	2313	Rev	ENST00000264657.5	NM_139276
<i>STAT6</i>	12	57489187	57505196	22	CDS completa	21	2544	Rev	ENST00000300134.3	NM_001178078
<i>TMEM30A</i>	6	75962638	75994632	7	CDS completa	7	1086	Rev	ENST00000230461.6	NM_018247

RESULTADOS

Esta sección comprende tres capítulos correspondientes a los tres trabajos de investigación de los que se compone la presente tesis doctoral.

En cada uno de los capítulos se describen los resultados obtenidos en relación con los objetivos planteados, así como una explicación detallada de las características de los pacientes incluidos en cada trabajo, descritos de forma global en la sección "Material y Métodos". Cada capítulo está precedido de un breve resumen que pretende facilitar una revisión rápida de la información contenida en los mismos.

I) CAPÍTULO 1: ESTUDIO DEL REORDENAMIENTO DE LOS GENES DE LA CADENA PESADA DE LAS INMUNOGLOBULINAS EN EL LINFOMA FOLICULAR Y SU PAPEL EN LA TRANSFORMACIÓN HISTOLÓGICA A LINFOMA AGRESIVO.

II) CAPÍTULO 2: CARACTERIZACIÓN GENÓMICA DE PACIENTES CON LINFOMA FOLICULAR. IDENTIFICACIÓN DE ALTERACIONES GÉNICAS ASOCIADAS CON LA EVOLUCIÓN CLÍNICA Y APLICACIÓN DEL m7-FLIPI EN NUESTRA SERIE.

III) CAPÍTULO 3: ESTUDIO MOLECULAR DE LA PROGRESIÓN Y TRANSFORMACIÓN HISTOLÓGICA DEL LINFOMA FOLICULAR A LINFOMA AGRESIVO. POSIBLES MODELOS DE EVOLUCIÓN CLONAL EN BASE A LA EXPERIENCIA DE UN SOLO CENTRO.

CAPÍTULO 1

Estudio del reordenamiento de los genes de la cadena pesada de las inmunoglobulinas en el linfoma folicular y su papel en la transformación histológica a linfoma agresivo.

RESUMEN

Introducción: El linfoma folicular (LF) es el segundo linfoma no Hodgkin (LNH) más frecuente caracterizado por su naturaleza indolente y heterogénea, cuya patogénesis permanece parcialmente desconocida. Se considera una enfermedad incurable en la que aproximadamente el 20% de los pacientes sufren una progresión temprana o son refractarios al tratamiento. Además, del 2 al 3% de los pacientes al año experimentan una transformación histológica (TH) a un linfoma más agresivo (LFt), considerado uno de los eventos más desfavorables en el pronóstico de los pacientes. La necesidad de identificar el grupo de pacientes de alto riesgo ha llevado al desarrollo de diversos índices pronósticos, pero ninguno de ellos es útil para predecir TH. Por ello, un mejor conocimiento de la biología de esta enfermedad permitiría identificar nuevos factores que al diagnóstico identifiquen de forma más precisa aquellos pacientes con mal pronóstico, para posibilitar el uso de estrategias terapéuticas adaptadas al riesgo. En este contexto, el estudio del repertorio de los genes IGHV y el estado de hipermutación somática (HMS), como parte de la biología de esta enfermedad, han sido escasamente analizados. A pesar de la importancia en otras neoplasias de célula B como la leucemia linfática crónica (LLC), en el LF sólo se han descrito series pequeñas y sin asociación clínico-pronóstica. Además, nunca se ha analizado su papel en el proceso de TH a linfoma agresivo.

Objetivos: El objetivo del presente capítulo es analizar en detalle el uso de los genes IGHV, IGHD e IGHJ y la tasa de HMS en la serie de pacientes con LF más grande descrita hasta la fecha, para mejorar nuestro conocimiento de la biología del LF y evaluar su impacto en la evolución clínica y el riesgo de TH. Los objetivos específicos fueron: 1) identificar las familias y genes IGHV, IGHD e IGHJ implicados en el reordenamiento V(D)J clonal de pacientes con LF; 2) estudiar su estado mutacional (HMS); 3) analizar el impacto de los genes IGHV más frecuentes y el estado mutacional en la evolución clínica de los pacientes con LF; y 4) analizar el papel de los genes IGHV en la TH de LF a linfoma agresivo.

Pacientes y métodos: Se estudiaron los genes IGHV, IGHD e IGHJ, y la tasa de HMS en la muestra tumoral de 187 pacientes con LF en el momento del diagnóstico, y su muestra pareada en el momento de la transformación en los 47 casos con TH. El reordenamiento clonal se identificó siguiendo el protocolo BIOMED-2

y posterior secuenciación mediante Sanger. Para el análisis de secuencias se empleó el software IMGT/V-QUEST y para la comparación estadística se utilizó el programa SPSS 23.0. Las comparaciones múltiples se llevaron a cabo con el método bilateral del test de Fisher, utilizando el paquete informático GraphPad Prism 4.0 y los *P*-valor fueron corregidos mediante la corrección de Bonferroni (*P_c*).

Resultados: Se identificó un reordenamiento V(D)J clonal en 138 de 187 casos con LF (74%), observando un sesgo en el repertorio de genes IGHV detectados. Los genes más frecuentes en la presente serie fueron IGHV4-34 (14%), IGHV3-23 (14%), IGHV3-48 (10%), IGHV3-30 (9%) e IGHV3-21 (7%). De los 130 pacientes en que pudo estudiarse el estado mutacional de IGHV, sólo se identificaron 4 casos sin HMS (3%). La relación clonal entre muestras pareadas LF-LFt se confirmó en 45 casos de los 47 con TH, quedando dos casos excluidos de los análisis posteriores. Se observaron diferencias significativas al comparar las frecuencias de estos genes con las descritas en otras neoplasias de células B maduras y células B normales CD5-/IgM+, siendo el hallazgo más interesante la ausencia de los genes IGHV3-34 e IGHV4-30 en uno o ambos tipos de LDCBG *de novo*, respectivamente, en comparación con su elevada frecuencia tanto en LF como en LFt. Por el contrario, al comparar los resultados obtenidos en la presente serie con los reportados en los pocos estudios publicados en LF hasta la fecha, las diferencias fueron escasas.

Tampoco se observaron grandes diferencias en cuanto al impacto de los genes IGHV en la evolución clínica de los pacientes con LF. No obstante, los pacientes no mutados o con uso de la familia IGHV5 presentaron peor curso clínico y menor supervivencia que el resto de pacientes. Por otro lado, el gen IGHV3-48 se mostró como un factor de riesgo de TH a linfoma agresivo, ya que apareció sobrerrepresentado en los casos con LFt (19%) respecto al LF sin TH a 5 años (5%). En el análisis multivariante del riesgo de TH, las variables que mostraron un valor pronóstico e independiente fueron el uso del gen IGHV3-48 y no haber recibido tratamiento previo a la fecha de último seguimiento o TH.

Discusión y conclusiones: En el presente estudio, se ha observado un sesgo en el uso de genes IGHV específicos que sugiere la participación de ciertos antígenos en la estimulación de estas células con expresión de determinadas Igs de superficie. Las diferencias observadas respecto a otras neoplasias de célula B madura podrían resultar útiles en el diagnóstico diferencial, favoreciendo la distinción entre un LDCBG derivado de la TH de un LF y un LDCBG *de novo*. La aportación más novedosa del estudio fue el análisis del papel de los genes IGHV en la TH a linfoma agresivo. La selección del gen IGHV3-48 en el reordenamiento V(D)J parece asociarse con transformación a linfoma agresivo, lo que podría ser un biomarcador útil de TH.

INTRODUCCIÓN

El linfoma folicular (LF) es el linfoma no Hodgkin (LNH) indolente más común (20-30%), con una incidencia aproximada de 5 nuevos casos por cada 100000 habitantes por año. El LF se caracteriza por su naturaleza indolente, mostrando generalmente tasas elevadas de respuesta al tratamiento en primera línea y mediana de supervivencia de 15 a 20 años.¹⁻³

Este tipo de linfomas se considera una enfermedad incurable caracterizada por un patrón de múltiples recaídas, disminución de la duración de la respuesta en las sucesivas recaídas y adquisición gradual de resistencia al tratamiento estándar. A pesar de la mejora en la eficacia de los tratamientos como consecuencia de la incorporación de regímenes inmunoquimioterápicos, principalmente del rituximab (anticuerpo monoclonal anti-CD20), el 20% de los pacientes experimentan progresión temprana o desarrollan resistencias al tratamiento durante los dos primeros años.^{1,4,5} Además, los pacientes con LF pueden sufrir un proceso de transformación histológica (TH) a un linfoma más agresivo, principalmente a linfoma difuso de célula B grande (LDCBG), con una tasa de transformación del 2-3% por año.⁶⁻⁸ El linfoma folicular transformado (LFt) implica una relación clonal entre el LF inicial y la forma agresiva, siendo considerado uno de los eventos más desfavorables en la naturaleza del LF.⁹ Esto se debe a bajas tasas de curación con las terapias convencionales y periodos cortos de supervivencia.¹⁰ Por tanto, la necesidad de identificar al grupo de pacientes con alto riesgo de recaídas y/o resistencias ha llevado al desarrollo de varios índices pronósticos para el LF como el FLIPI,¹¹ FLIPI2¹² o la tasa de respuesta completa a los 30 meses (CR30, por sus siglas en inglés) descrita recientemente.⁴ Sin embargo, con excepción del FLIPI, estos índices son poco útiles para predecir TH. Sin embargo, el FLIPI es poco específico en predicción, ya que hay pacientes clasificados de bajo riesgo que sufren TH y pacientes en el grupo de alto riesgo que nunca llegan a transformarse. Por ello, desentrañar la biología y patogénesis de esta enfermedad mejoraría la identificación de los pacientes con mal pronóstico en el momento del diagnóstico, permitiendo el uso de estrategias de tratamiento adaptadas al riesgo.

En cuanto a la ontogénesis del LF, es bien sabido que esta enfermedad surge de la proliferación clonal de las células B del centro germinal (CG) que han experimentado una transformación maligna, resultando en un crecimiento con patrón folicular y arquitectura típica de CG normal.^{2,13} Estas células B CG albergan un reordenamiento clonal de los genes de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (IGH), que ocurre en los primeros pasos de la diferenciación B, dando lugar a una unión completamente funcional de los segmentos génicos IGHV (*variable*)-IGHD (*diversity*)-IGHJ (*joining*) del gen *IGH*. Tanto el repertorio de los genes IGHV como el estado de hipermutación somática (HMS) han sido extensamente analizados en los linfomas de célula B, mostrando un sesgo en el uso de estos genes en la leucemia linfática crónica (LLC), LDCBG, linfoma esplénico

de la zona marginal (LEZM), macroglobulinemia de Waldenström (MW), linfoma de células del manto (LCM) y linfoma primario del sistema nervioso central.¹⁴⁻²¹ Además, algunos genes IGHV se han asociado con el pronóstico de estos pacientes, como es el caso del estado no mutado del reordenamiento en IGH o la presencia del gen IGHV3-21 perteneciente al subgrupo #2 de receptores de célula B estereotipados, ambos asociados con un pronóstico desfavorable en LLC.^{15;16;22;23}

En el caso del LF, el repertorio de los genes IGHV ha sido poco estudiado y sólo ocasionalmente reportado en series de pacientes pequeñas, generalmente sin analizar su asociación con la clínica de la enfermedad.²⁴⁻²⁶ Recientemente, Berget *et al.* han mostrado una asociación entre la presencia de la familia IGHV5 y/o el uso de más de un subgrupo o familia de genes IGHV con supervivencia global acortada en una serie de 106 pacientes con LF.¹³ Sin embargo, no hay información sobre el papel de estos genes en la respuesta al tratamiento o en el riesgo de TH a linfoma agresivo.

Teniendo en cuenta lo descrito previamente, el objetivo del presente capítulo fue analizar en detalle el uso de los genes IGHV, IGHD e IGHJ y la tasa de HMS en la serie de LF más grande hasta la fecha, con el fin de evaluar su impacto en la evolución clínica y riesgo de TH.

RESULTADOS

1. Características de los pacientes

▪ Características clínico-biológicas

Se estudiaron 187 pacientes con LF grado 1-3A confirmado histológicamente de acuerdo a la clasificación de la OMS de 2017,² diagnosticados entre enero de 1995 y mayo de 2017. Aquellos pacientes con histología compuesta (LF+LDCBG) o LF grado 3B en el momento del diagnóstico no fueron incluidos en el estudio,²⁷ de igual forma que aquellos sin muestra biológica y/o datos clínicos disponibles.

Las características clínico-biológicas de la serie se detallan en la Tabla 1. La mediana de edad de los pacientes fue 58 años (intervalo, 19-87 años), siendo mujeres el 53% del total de la serie (n=99). Respecto al grado histológico, la mayoría de los pacientes presentaron grado 1 al diagnóstico (49%), siendo minoritario el grupo de pacientes con grado 3A (12%). La distribución de los pacientes en los diferentes grupos de riesgo en función del índice pronóstico FLIPI fue equitativa, estando el 36% de los casos en el grupo de alto riesgo (n=54), mientras que el 64% de la serie fue clasificado como estadio IV de Ann Arbor.

Del total de pacientes incluidos en este capítulo, 24 pacientes (13%) no recibieron tratamiento para el LF hasta la fecha de último seguimiento o TH a linfoma agresivo. Los 163 pacientes restantes (87%) recibieron tratamiento con intención curativa para el LF durante su enfermedad, siendo en su mayoría (98/163 pacientes, 60%) tratados con esquemas inmunoquimioterápicos basados en rituximab (R-IQT). Dentro de este grupo tratado con R-IQT, el tratamiento de elección en primera línea fue R-CHOP, aplicado en 68 de 98 pacientes (69%). El resto de pacientes (65/163 pacientes), que recibieron esquemas terapéuticos distintos de R-IQT, fueron tratados con esquemas quimioterápicos sin rituximab (48/65 pacientes, 74%), radioterapia (RT) o RT en combinación con rituximab (13/65 pacientes, 20%), o con rituximab en monoterapia (4/65 pacientes, 6%). Tras finalizar el tratamiento de inducción en primera línea, 73 pacientes recibieron tratamiento de mantenimiento con rituximab en dosis 375 mg/m² cada dos meses durante dos años.

▪ Evolución clínica de la serie

En la serie global de pacientes con LF, tras una mediana de seguimiento de 7.9 años (intervalo, 0.6-21.4 años) para los pacientes vivos, 48 pacientes murieron por causas relacionadas o ajenas al linfoma y en 47 de los 187 casos incluidos (25%) el estudio histológico fue sugestivo de transformación a linfoma agresivo. La supervivencia global (SG) de la serie a 5 y 10 años fue del 82% y 70%, respectivamente, y del 92% a 5 años para los pacientes clasificados como bajo riesgo según el índice pronóstico FLIPI ($P < 0.01$).

Tabla 1. Características clínico-biológicas de los pacientes incluidos en el capítulo 1 (n=187).

Variable	Serie capítulo 1, n (%)
Edad, años (mediana, intervalo)	58 (19-87)
Sexo M / H	99 (53) / 88 (47)
Grado histológico*	
1	84 (48.8)
2	67 (39)
3A	21 (12.2)
FLIPI*	
0-1 (Bajo riesgo)	49 (32.9)
2 (Riesgo intermedio)	46 (30.9)
3-5 (Alto riesgo)	54 (36.2)
Ann Arbor*	
I	24 (14.2)
II	18 (10.7)
III	18 (10.7)
IV	109 (64.5)
Terapia en primera línea	
Nunca tratados	24 (12.8)
IQT basada en rituximab	98 (52.4)
R-CHOP	68 (69.4)
R-Bendamustina	11 (11.2)
R-CVP	3 (3.1)
Otros	16 (16.3)
QT sin rituximab	48 (25.7)
CHOP	35 (72.9)
Basados en fludarabina	3 (6.3)
Otros	10 (20.8)
Radioterapia sola o con rituximab	13 (7)
Rituximab en monoterapia	4 (2.1)
Mantenimiento con rituximab*	73 (39)

*Dato de grado histológico disponible para 172 (92%) pacientes; FLIPI disponible para 149 (80%) pacientes; Ann Arbor disponible para 169 (90%) pacientes; Mantenimiento calculado para 147 (79%) pacientes. CHOP, ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, prednisona; CVP, ciclofosfamida, vincristina, prednisona; FLIPI, Índice pronóstico internacional del LF; IQT, Inmunoquimioterapia; QT, Quimioterapia; R, rituximab.

Dentro del grupo de pacientes que recibieron tratamiento (n=163), 87 pacientes (53%) alcanzaron respuesta completa (RC) tras la inducción (87% evaluadas por TC y 13% por PET/TC), 63 pacientes hicieron respuesta parcial (RP, 93% evaluadas por TC y 7% por PET/TC) y 12 casos (7%) progresaron o mantuvieron enfermedad estable tras el tratamiento, clasificados como no respuesta y/o progresión (NR/Progresión). El caso restante no completó la inducción debido a complicaciones ajenas al tratamiento del LF. Transcurridos 30 meses desde la fecha de inicio del tratamiento en primera línea, 80 pacientes (49%) se encontraban en respuesta completa (CR30). La supervivencia libre de fracaso terapéutico (SLFT) a 5 y 10 años para los pacientes de la

serie que recibieron tratamiento (n=163) fue del 50% y 36%, respectivamente. La evolución clínica de la serie se resume en la Figura suplementaria S1.

2. Repertorio de genes IGHV, IGHD e IGHJ en LF

Se analizó el reordenamiento V(D)J de *IGH* mediante el protocolo BIOMED-2 (apartado 2.4.2, sección “Material y Métodos”) en los 187 pacientes con LF incluidos en el momento del diagnóstico, detectando un reordenamiento V(D)J clonal en un total de 138 casos (74%), desde FR1 en su mayoría (80%). De los 49 casos restantes en que no se obtuvo un reordenamiento clonal, el 82% (40/49 casos) presentó un patrón policlonal, o clonal con elevado fondo policlonal, que impidió detectar el reordenamiento del clon tumoral, tanto desde FR1 como desde FR2. En el 18% restante (9/49 casos) no se obtuvo amplificación debido a la mala calidad de la muestra, baja concentración y/o elevada tasa de mutación que impidió la hibridación del *primer*. Las características clínico-biológicas y evolución clínica de la serie de pacientes con reordenamiento V(D)J clonal (n=138) en comparación con la serie global (n=187) se describen en la Tabla Suplementaria S1.

Los subgrupos o familias IGHV más frecuentes presentes en el reordenamiento V(D)J clonal fueron IGHV3 (63%) e IGHV4 (27%) (Tabla Suplementaria S2). Además, se identificó un total de 35 genes IGHV funcionales, siendo los más representados IGHV4-34 (14%), IGHV3-23 (14%), IGHV3-48 (10%), IGHV3-30 (9%) e IGHV3-21 (7%) (Figura 1 y Tabla Suplementaria S3). En cuanto a los genes IGHD, los subgrupos más frecuentes fueron IGHD3 (37%) e IGHD2 (25%) (Tabla S2), mientras que los genes más representados en la serie fueron IGHD3-10 (12%) e IGHD3-22 (10%) (Figura Suplementaria S2). Por último, el subgrupo de genes IGHJ más prevalente en la serie fue IGHJ4 (48%) (Tabla S2).

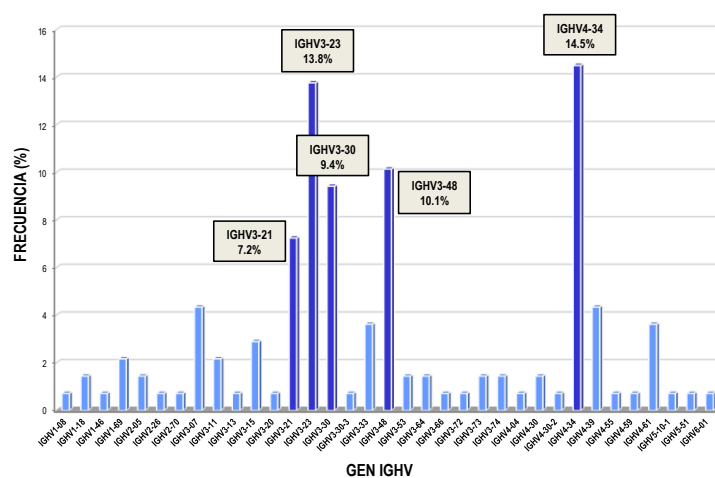


Figura 1. Repertorio de genes IGHV en el linfoma folicular (n=138). Los 35 genes IGHV identificados en la serie de pacientes con reordenamiento V(D)J clonal se representan a lo largo del eje X del gráfico de barras.

3. Estado mutacional de IGHV y longitud del CDR3 en LF

El estado mutacional de IGHV o hipermutación somática (HMS) se pudo estudiar en 130 de 138 casos (94%) con reordenamiento V(D)J clonal, detectando HMS en el 97% de ellos (126/130 casos). De manera global, el porcentaje de identidad de la línea germinal con el gen IGHV más cercano varió de 67.2% a 100%, con una media de 87.2%. Sin embargo, no se observaron diferencias en la proporción de pacientes con HMS entre los diferentes subgrupos IGHV, como se puede observar en la Figura 2A.

Se observaron secuencias no mutadas de IGHV sólo en cuatro pacientes (3%) de la serie. En tres de ellos, la identidad con la línea germinal fue del 100%, mientras que el caso restante mostró una identidad del 99.8%. Estas secuencias sin HMS se observaron en los subgrupos IGHV1 e IGHV3, siendo IGHV1-69, IGHV3-21 e IGHV3-30-3 los genes afectados (Figura 2B).

En cuanto a la región CDR3, fue posible la identificación de su secuencia peptídica en 113 de 138 casos (82%) con reordenamiento clonal. La mediana de su longitud fue 16 aminoácidos (AA), con una variación desde 8 AA en el caso con CDR3 de menor longitud, hasta 28 AA en el de mayor longitud, sin observar diferencias estadísticamente significativas en la longitud media entre subgrupos o genes IGHV (Figura Suplementaria S3).

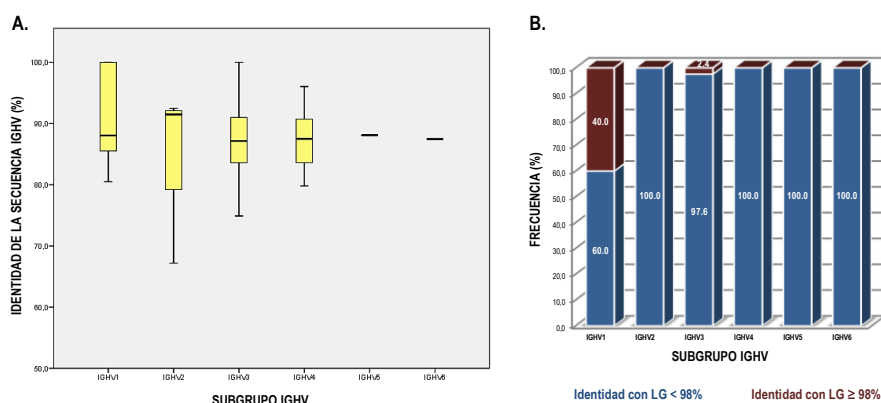


Figura 2. Identidad de los genes IGHV en la serie de pacientes con linfoma folicular (n=130). (A) Diagrama *boxplot* que muestra el porcentaje de identidad con la línea germinal (LG) de las 130 secuencias obtenidas de los 138 pacientes estudiados, agrupadas en función del subgrupo IGHV que expresan. La línea horizontal representa la mediana del porcentaje de identidad para cada subgrupo IGHV. (B) Frecuencia de casos mutados (identidad con la LG < 98%) y no mutados (identidad con la LG > 98%) en función del subgrupo IGHV en las 130 secuencias estudiadas.

4. Análisis comparativo del reordenamiento IGH en LF

▪ Comparación con otras series de LF

Actualmente, no son muchos los estudios publicados que analicen el uso de subgrupos y/o genes IGHV en LF y, en la mayoría de ellos, el número de casos estudiados es limitado. En la Tabla 2 se resumen los datos

de frecuencias publicados hasta la fecha en LF para todos los subgrupos IGHV y para los genes IGHV más frecuentes en el presente estudio.^{13,24-26,28-30} Como se puede observar, de forma global no se observan diferencias significativas entre los distintos estudios, con la excepción del subgrupo IGHV1 que mostró frecuencias más bajas respecto a la serie de Catherwood *et al.* (5% vs. 36%, $P < 0.01$, $P_c < 0.05$) y Berget *et al.* (19%, $P < 0.01$, $P_c < 0.05$).^{13,30} En comparación con la serie de Berget *et al.*, la más grande hasta el presente estudio con 99 pacientes con reordenamiento clonal, los resultados son similares a los reportados por nuestro grupo con alguna excepción llamativa como la baja frecuencia del subgrupo IGHV4 (27% vs. 11%, $P < 0.01$, $P_c < 0.05$) y elevada de IGHV5 (1% vs. 8%, $P < 0.05$, $P_c < 0.1$), además de las diferencias en IGHV1 previamente comentadas. Además, el gen IGHV4-34, uno de los más frecuentes en nuestra serie, se mostró completamente ausente en la serie de Berget *et al.* (14% vs. 0%, $P < 0.01$, $P_c < 0.05$).¹³

Tabla 2. Comparación de todos los subgrupos y los genes IGHV más frecuentes en el presente estudio con otros estudios publicados hasta la fecha en LF.

	Presente estudio n (%)	Bahler DW n (%)	Hsu FJ n (%)	Rosenquist R n (%)	Noppe SM n (%)	Aarts WM n (%)	Catherwood MA n (%)	Berget E n (%)
IGHV	<i>n=138</i>	<i>n=36</i>	<i>n=67</i>	<i>n=19</i>	<i>n=55</i>	<i>n=30</i>	<i>n=25</i>	<i>n=99</i>
1	7 (5.1)	3 (8)	4 (6)	3 (15.8)	6 (11)	2 (6.7)	9 (36)**	19 (19.2)**
2	4 (2.9)	0 (-)	1 (1.5)	1 (5.3)	0 (-)	0 (-)	1 (4)	0 (-)
3	87 (63)	24 (67)	45 (67)	9 (47.4)	39 (70)	18 (60)	11 (44)	57 (57.7)
4	37 (26.8)	8 (22)	16 (24)	4 (21.1)	10 (19)	8 (26.7)	3 (12)	11 (11.5)**
5	2 (1.4)	1 (3)	1 (1.5)	1 (5.3)	0 (-)	1 (3.3)	1 (4)	8 (7.7)*
6	1 (0.7)	0 (-)	0 (-)	1 (5.3)	0 (-)	0 (-)	0 (-)	4 (3.8)
7	0 (-)	0 (-)	0 (-)	0 (-)	0 (-)	1 (3.3)	0 (-)	0 (-)
3-21	10 (7)	-	-	-	-	0 (-)	1 (4)	2 (2)
3-23	19 (14)	-	-	-	-	9 (30)	1 (4)	12 (12.5)
3-30	13 (9)	-	-	-	-	5 (17)	1 (4)	6 (6)
3-48	14 (10)	-	-	-	-	0 (-)	3 (12)	11 (11.5)
4-34	20 (14)	-	-	-	-	3 (10)	1 (4)	0 (-)**

Las referencias para las comparaciones son las siguientes: Bahler DW *et al.*, Blood 1991; Hsu FJ *et al.*, Blood 1995; Rosenquist R *et al.*, Eur. J. Haematol 1999; Noppe SM *et al.*, Br. J. Haematol 1999; Aarts WM *et al.*, Blood 2000; Catherwood MA *et al.*, J. Clin. Pathol 2007; Berget E *et al.*, Leuk. Res 2015. Las diferencias significativas entre el presente estudio y el resto son representadas con un * si $P < 0.05$, o con dos ** si $P < 0.01$. En negrita se representan aquellas comparaciones que se mantienen significativas tras la corrección de Bonferroni ($P_c < 0.05$).

▪ Comparación con otras neoplasias de célula B madura y población celular B normal

Con el objetivo de identificar características únicas del LF, se compararon los subgrupos y genes IGHV de los 138 casos de LF con reordenamiento V(D)J clonal, con los resultados descritos en literatura para células B normales CD5-/IgM+ y otras neoplasias de célula B madura, específicamente LDCBG, LCM, LLC, LEZM, leucemia de células peludas o tricoleucemia (LCP), mieloma múltiple (MM) y MW (Tabla 3).^{18,20,31-36} Se tuvieron en cuenta para este análisis comparativo las series más grandes publicadas para cada neoplasia.

Tras realizar el análisis comparativo se observó que el subgrupo IGHV1 resultó significativamente infrarrepresentado en el LF respecto al resto de neoplasias de célula B madura (5% vs. 15-30%, $P < 0.05$, $P_c < 0.05$), con excepción de la MW (7%). Por el contrario, el subgrupo IGHV3 se mostró sobrerrepresentado en el LF respecto al LDCBG (63% vs. 44%, $P < 0.01$, $P_c < 0.05$), LLC (48%, $P < 0.01$, $P_c < 0.05$), LCM (52%, $P < 0.05$, $P_c < 0.1$), LEZM (50%, $P < 0.05$, $P_c < 0.1$) y MM (49%, $P < 0.01$, $P_c < 0.1$), aunque las diferencias estadísticas se perdieron tras la corrección de Bonferroni en los tres últimos casos.

Tabla 3. Comparación de los subgrupos IGHV, IGHD e IGHJ y de los genes IGHV más frecuentes en la presente serie de pacientes con LF, con las frecuencias reportadas para otras neoplasias de célula B madura y células B normales CD5-/IgM+.

IGH	LF (n=138)	LDCBG (n=103)	LCM (n=807)	LLC (n=7596)	LEZM (n=133)	LCP (n=102)	MM (n=270)	MW (n=58)	CD5-/IgM+ (n=206)
IGHV									
1	5.1	16.5**	15.5**	23.8**	30.1**	14.7*	15.6**	6.9	13.1*
2	2.9	1.9	1.5	3.4	0.8	2.9	6.3	0	1.9
3	63.0	43.7**	51.6*	48.2**	49.6*	53.9	48.9**	75.9	53.9
4	26.8	33.0	25.8	20.6	17.3	23.5	20.4	13.8	24.8
5	1.4	3.9	5.1	2.5	2.3	1.0	7.8	1.7	2.9
6	0	1.0	0.6	1.2	0	2.9	1.1	1.7	2.4
7	0	0	0	0.4	0	1.0	0	0	1.0
3-21	7.2	4.8	16.5**	4.7	3.0	3.1	1.5**	5.2	0**
3-23	13.8	9.7	7.4*	8.5*	18.0	18.1	5.0**	29.3*	12.1
3-30	9.4	0**	3.5**	5.5	6.0	8.5	10.0	8.6	5.8
3-48	10.1	5.8	3.6**	3.9**	3.8	5.3	1.8**	0*	4.4*
4-34	14.5	15.5	14.6	8.9*	7.5	7.4	0.9**	0**	3.9**
IGHD									
1	9.6	10.7	10.6	8.2	5.2	12.7	7.6	27.3	6.4
2	24.8	21.4	17.4	19.6	15.5	12.7	24.2	4.5	21.2
3	36.8	35.9	34.2	40.3	46.6	41.2	25.8	18.2	37.2
4	12.0	5.8	8.5	6.3	7.8	6.9	10.6	13.6	10.9
5	4.0	9.7	8.3	8.8	9.5	6.9	13.6	9.1	10.3
6	12.8	14.6	20.3	15.9	15.5	18.6	12.1	27.3	10.3
7	0	1.9	0.6	0.7	0	1.0	6.1	0	3.8
IGHJ									
1	0.8	3.9	0.6	1.8	1.5	2.9	1.4	4.4	1.0
2	2.4	4.8	3.5	2.3	0	3.9	1.4	8.9	2.0
3	11.9	12.6	7.6	9.9	14.3	9.8	17.8	13.3	8.0
4	47.6	44.7	43.7	13.3	37.6	46.1	53.4	35.6	55.0
5	17.5	12.6	15.0	10.5	19.5	12.7	8.2	13.3	10.0
6	19.8	21.4	29.6	32.3	27.1	24.5	17.8	24.4	24.0

Frecuencias expresadas en porcentaje. Las referencias para la comparación son las siguientes: Sebastian *et al.*, Am J Pathol 2012 (LDCBG, linfoma difuso de célula B grande); Hadzidimitriou *et al.*, Blood 2011 (LCM, leucemia de células del manto), Agathangelidis *et al.*, Blood 2012 (LLC, leucemia linfática crónica), Zibellini *et al.*, Haematologica 2010 (LEZM, linfoma esplénico de la zona marginal), Arons *et al.*, Blood 2011 (LCP, leucemia de células peludas), González *et al.*, Blood 2007 (MM, mieloma múltiple), Martín-Jiménez *et al.*, Haematologica 2007 (MW, macroglobulinemia de Waldenström), y Brezinschek *et al.*, J Clin Invest 1997 (células CD5-/IgM+). Las diferencias significativas entre el LF y otras neoplasias de célula B madura o células B CD5-/IgM+ son representadas con un * si $P < 0.05$, o con dos ** si $P < 0.01$. En negrita son representadas aquellas comparaciones que mantienen su significación tras la corrección de Bonferroni ($P_c < 0.05$).

En cuanto a los genes IGHV se observó que el gen IGHV3-21 (7%), que resultó ser frecuente en LF, se mostró completamente ausente en la población de células B normales CD5-/IgM+ ($P < 0.01$, $P_c < 0.05$) y relativamente infrarrepresentado en otras neoplasias de célula B madura.^{18;20;31-38} En el caso del gen IGHV3-30 (9%) se observaron diferencias estadísticamente significativas especialmente con el LDCBG, donde este gen se mostró completamente ausente ($P < 0.01$, $P_c < 0.05$).²⁰ En el caso del gen IGHV3-48, se observó una mayor frecuencia en LF respecto al resto de neoplasias de célula B madura y, también, respecto a la población de células B normales (10% vs. 0-6%, $P < 0.05$, $P_c < 0.05$). Por último, el gen IGHV4-34 resultó ser más frecuente en el LF (14%) que en las células B normales CD5-/IgM+ (4%, $P < 0.01$, $P_c < 0.05$), en el MM (1%, $P < 0.01$, $P_c < 0.05$) o la MW, donde se mostró completamente ausente (0%, $P < 0.01$, $P_c = 0.06$).^{18;31;36}

5. Análisis comparativo del reordenamiento IGH en LFt con LF y LDCBG

El estudio histológico de la evolución de la enfermedad fue sugestivo de transformación a linfoma agresivo (LFt) en 47 pacientes (25%). La relación clonal entre las muestras pareadas tomadas en el momento del diagnóstico y TH (LF-LFt) fue confirmada en 45 de los 47 casos (96%) mediante el estudio del reordenamiento V(D)J (BIOMED-2) o mediante la obtención del punto de corte de la t(14;18). Los dos casos restantes fueron excluidos debido a la presencia en ellos de clones diferentes en el momento del diagnóstico y TH. De los 45 LFt clonalmente relacionados se detectó el reordenamiento V(D)J clonal en 31 casos (69%), pudiendo obtener en ellos los genes IGHV, IGHD e IGHJ utilizados en cada caso (31/138 casos (22%) con gen IGHV disponible) (Tabla suplementaria S4-S5 y Figura Suplementaria S4).

Con el propósito de identificar características exclusivas del LFt, se realizó una comparación entre este grupo y los casos con LF sin TH con un mínimo de seguimiento de 5 años (n=63), además de los casos con LDCBG de nuevo diagnóstico o *de novo* tipo centro germinal (CGB, n=32) y no centro germinal (no-CGB, n=48) previamente analizados por nuestro grupo.²⁰ Tras realizar dicha comparación se observó una menor frecuencia en el uso del subgrupo IGHV1 por parte de los casos con LFt respecto al LDCBG no-CGB (3% vs. 23%, $P < 0.05$), mientras que, por el contrario, el subgrupo IGHV3 se mostró sobrerrepresentado en el LFt en comparación con el LDCBG no-CGB (74% vs. 40%, $P < 0.01$). Sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a subgrupos IGHV entre el LFt y el LF sin TH.

En lo relativo a los genes IGHV, el gen IGHV3-48 se mostró significativamente más representado en los pacientes con TH (19%) respecto a aquellos con LF sin TH (5%, $P = 0.05$) y con LDCBG no-CGB (4%, $P < 0.05$) (Figura 3). El gen IGHV3-30, frecuentemente usado en LFt (13%), se mostró completamente ausente en ambos tipos de LDCBG *de novo* ($P < 0.05$). De forma similar, el gen IGHV4-34 se encontró sobrerrepresentado en el LFt

respecto al LDCBG CGB, donde no se encontró en ninguno de los casos (16% vs. 0%, $P = 0.05$), aunque sí se observó en el LDCBG no-CGB (25%) (Figura 3). La significación estadística se perdió en todos los casos tras la corrección de Bonferroni debido al número relativamente bajo de casos en cada uno de los grupos comparativos.

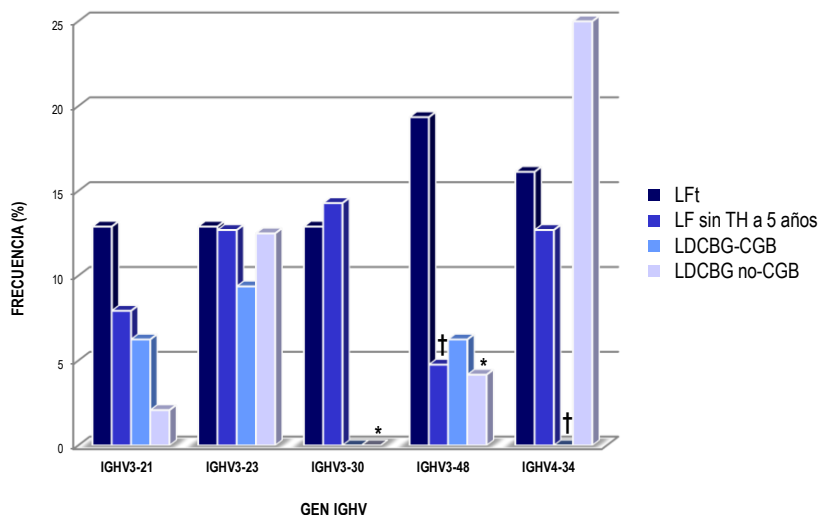


Figura 3. Comparación de los genes IGHV más frecuentes en LfT con LF sin TH a 5 años y LDCBG CGB/no-CGB. Los cinco genes más frecuentemente expresados en la serie con reordenamiento V(D) clonal se representan a lo largo del eje X del gráfico de barras. * $P < 0,05$ y † indica comparación próxima a la significación. CGB, tipo centro germinal B; LDCBG, linfoma difuso de célula B grande; LfT, linfoma folicular transformado; no-CGB, tipo no centro germinal B; TH, transformación histológica.

6. Efecto del uso de genes IGHV e HMS en la evolución clínica de la serie

▪ Evolución clínica de la serie global

Debido a la heterogeneidad en cuanto al esquema terapéutico utilizado en los 163 pacientes tratados como consecuencia del carácter retrospectivo del estudio, el análisis clínico se llevó a cabo en el grupo de pacientes tratado con R-IQT ($n=98$). En este grupo, 39 pacientes (40%) alcanzaron RC tras el tratamiento de inducción y 48 pacientes (54%) se encontraban en RC tras 30 meses desde el inicio del tratamiento (CR30), siendo su SLFT a 5 y 10 años del 51% y 29%, respectivamente.

Sobre este grupo de pacientes tratados homogéneamente, se estudió el efecto de las familias y genes IGHV en la evolución clínica, observando que los dos pacientes con selección de la familia IGHV5 presentaron peor curso clínico que el resto de pacientes y ambos murieron antes de alcanzar la mediana de seguimiento de la serie. Sin embargo, no se observó asociación significativa del uso de genes IGHV con la respuesta al tratamiento ni con CR30, considerando sólo a los 130 pacientes en quienes se evaluó la respuesta por TC. Tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas respecto a SLFT o SG.

Los cuatro pacientes sin HMS, presentaron FLIPI de riesgo intermedio/alto, con un nivel de $\beta 2$ -microglobulina normal. Tres de estos cuatro pacientes recibieron R-IQT, pero ninguno de ellos alcanzó RC a los

30 meses desde la fecha de inicio del tratamiento ya que todos ellos presentaron fracaso terapéutico antes de alcanzar los 5 años de seguimiento. Por tanto, su SLFT a 5 años fue significativamente inferior que la de los casos mutados (0% vs. 57%, $P < 0.001$), y dos de ellos murieron por progresión de su enfermedad a los 29 y 40 meses tras su diagnóstico.

▪ **Riesgo de transformación histológica (TH)**

Considerando sólo a los 45 pacientes que sufrieron TH clonalmente relacionada, 18 pacientes murieron antes de alcanzar la mediana de seguimiento, que fue 10.2 años para los pacientes vivos (intervalo, 1.2-21.4 años), siendo su SG del 82% y 59% a 5 y 10 años, respectivamente. La mediana de tiempo hasta la transformación (TTT, por sus siglas en inglés) fue de 4.4 años desde el diagnóstico de LF (intervalo, 0.1-19.6 años), con un riesgo estimado de TH a 10 años del 84%. Esto implica que el 53% de los pacientes (24/45 LFt) habían sufrido TH antes de los 5 años de seguimiento, y el 31% (14/45 LFt) lo hicieron entre los 5 y 10 años desde el diagnóstico. Por otro lado, 33 de los 45 pacientes con LFt (73%) habían recibido tratamiento para el LF sintomático antes de su transformación a linfoma agresivo, mientras que el resto de pacientes nunca fueron tratados durante su etapa indolente, hasta alcanzar la fecha de TH. En este contexto, aquellos pacientes que nunca habían recibido tratamiento antes de la transformación ($n=12$) presentaron mayor riesgo de TH a 10 años (100% vs. 79%, $P < 0.01$) y una mediana de TTT más corta (2.9 vs. 6.6 años, $P < 0.01$) que los pacientes tratados en su etapa de LF ($n=33$) (Figura 4A). Este hallazgo se reprodujo teniendo en cuenta la serie global ($n=187$), ya que el riesgo de TH a 10 años resultó significativamente mayor para los pacientes con LF que nunca habían recibido tratamiento que en los tratados durante su etapa de LF (85% vs. 24%, $P < 0.01$; Figura 4B). En lo que respecta a los genes IGHV, seis de los 14 pacientes (43%) que seleccionaron el gen IGHV3-48 en el momento del diagnóstico sufrieron TH a linfoma agresivo, resultando en un riesgo de TH a 10 años mayor que el resto de pacientes con otros genes IGHV (71% vs. 25%, $P < 0.05$; Figura 5). Estos resultados mantuvieron su significación tras excluir del análisis los 7 casos (5%) con un seguimiento limitado, menor de 30 meses.

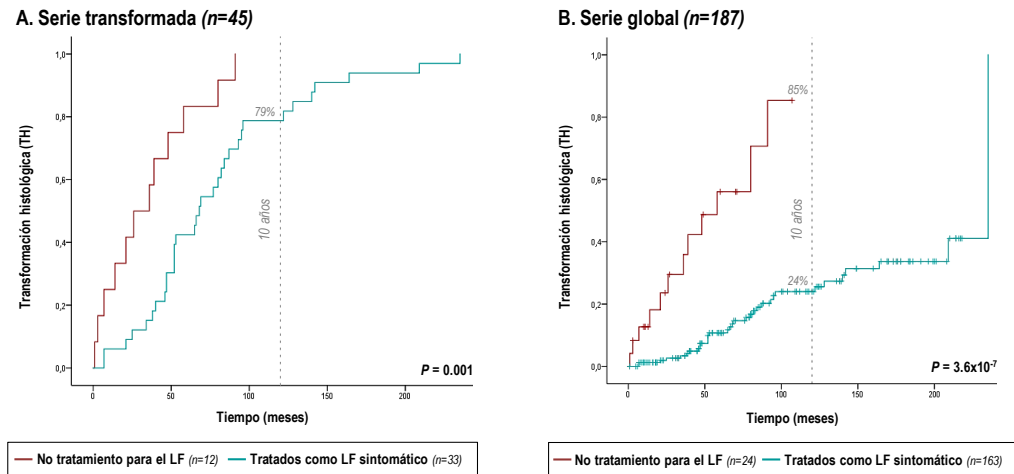


Figura 4. Análisis Kaplan-Meier de la transformación histológica (TH) a 10 años en (A) sólo los pacientes con linfoma folicular transformado (LFt, n=45) y (B) la serie global de pacientes incluidos en el estudio (n=187) en función de la ausencia o no de tratamiento durante la etapa indolente. Los pacientes que no han recibido tratamiento para el LF hasta la fecha de último seguimiento o TH se representan con una línea granate, mientras que los tratados durante la etapa folicular son representados con una línea azul. La línea vertical discontinua indica 10 años de seguimiento.

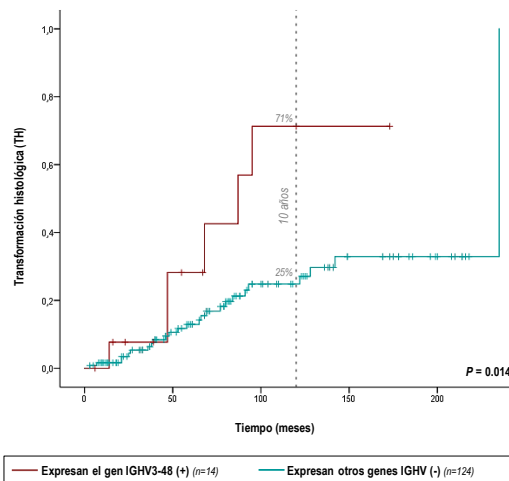


Figura 5. Análisis Kaplan-Meier de la transformación histológica (TH) a 10 años para el uso del gen IGHV3-48. La presencia o ausencia del IGHV3-48 se representa con una línea granate o azul, respectivamente. La línea vertical discontinua indica 10 años de seguimiento.

En el análisis multivariante, las variables asociadas con mayor riesgo de TH a 10 años de forma independiente fueron no haber recibido tratamiento en la etapa indolente como LF (HR: 21.2, IC 95%: 6.3-70.7) y expresar el gen IGHV3-48 (HR: 5.0, IC 95%: 1.5-17.2) (Tabla 4).

Tabla 4. Resultados del análisis univariante y multivariante de los factores implicados en la incidencia de transformación histológica (TH) a 10 años.

Variable	TH (%) a 10 años	U (P-valor)	M (P-valor)	HR [IC 95%]
Grado histológico LF				
1 (<i>referencia</i>)	26.8%	0.556	-	-
2	25.6%		0.976	1.0 [0.4-2.7]
3A	28.6%		0.126	3.7 [0.7-19.3]
FLIPI				
Bajo (<i>referencia</i>)	27.2%	0.834	-	-
Intermedio	26.0%		0.393	0.6 [0.2-1.9]
Alto	20.1%		0.677	1.3 [0.4-4.1]
Nunca tratados (<i>si</i>)	85.3%	3.6×10^{-7}	6.7×10^{-7}	21.2 [6.3-70.7]
Gen IGHV3-48 (<i>si</i>)	71.3%	0.014	0.010	5.0 [1.5-17.2]

FLIPI, índice pronóstico internacional para el linfoma folicular (LF); HR, hazard ratio; IC, intervalo de confianza; M, análisis multivariante; TH, transformación histológica; U, análisis univariante.

DISCUSIÓN

A pesar de que el LF es la variante indolente de LNH más frecuente, su ontogenia no es bien conocida. En el presente trabajo se describe la serie más grande hasta la fecha de pacientes con LF (n=187) en que se ha analizado extensamente el uso de los genes IGHV, IGHD e IGHJ que forman parte de su reordenamiento V(D)J clonal. Además, se llevó a cabo un análisis de asociación con la evolución clínica y el riesgo de transformación histológica (TH) a linfoma agresivo. Como resultado, se observó un sesgo en el uso de genes IGHV concretos, hecho que aporta una nueva visión en la ontogenia del LF en cuanto a la diferenciación de la célula B a partir de la cual se origina. Además, el LF parece mostrar diferencias claras respecto al uso de genes IGHV y el estado mutacional de los mismos con el resto de neoplasias de célula B madura. Por tanto, estos hallazgos sugieren la participación de ciertos antígenos en el desarrollo del LF, estimulando la proliferación de células B que expresan inmunoglobulinas (Igs) de superficie codificadas a partir de genes IGHV específicos.

No se observaron diferencias significativas al comparar las frecuencias de los subgrupos IGHV entre la serie de LF en el presente trabajo y las de células B normales CD5-/IgM+, a excepción del subgrupo IGHV1 que mostró menor frecuencia en la serie de LF.³¹ Sin embargo, se observó un fuerte sesgo hacia un mayor uso de los genes IGHV4-34, IGHV3-23, IGHV3-48, IGHV3-30 e IGHV3-21 en LF respecto a la población B normales CD5-/IgM+, implicando alrededor de la mitad de la serie.³¹ Estos resultados son similares a los reportados previamente en LF por otros grupos, con ligeras diferencias en el uso del subgrupo IGHV1, menos frecuente en nuestra serie,^{13;24-26;28-30} y del gen IGHV4-34, que resultó más frecuente en la presente serie que en otras series de LF.^{13;26;30} Estas diferencias podrían deberse probablemente a las limitaciones en el tamaño muestral de las series previas de LF, sin descartar posibles razones geográficas, étnicas y raciales.³⁹ Además, la mayoría de los estudios carecen de análisis del uso de genes IGHV, mostrando exclusivamente una descriptiva de los subgrupos, y no evalúan su asociación con la evolución clínica y pronóstico de los pacientes.

En comparación con otras neoplasias de célula B madura, también se observó un sesgo en el uso de genes IGHV en el LF. En esta comparación se incluyeron las series más largas publicadas hasta la fecha en las que se ha analizado el uso de genes IGHV, siendo de nuestro grupo las publicadas en LDCBG, MM y MW, descartando por tanto posibles sesgos como consecuencia de diferencias geográficas, étnicas o raciales. En este contexto, el hallazgo más interesante fue la elevada frecuencia de los genes IGHV3-30 e IGHV4-34 en el linfoma folicular transformado (LFt) en comparación con su baja frecuencia o ausencia completa bien en el LDCBG tipo CGB o no-CGB.^{20;40;41} La selección incrementada del gen IGHV4-34 en este grupo de pacientes con LFt podría favorecer una célula de origen más inmadura o con desarrollo fuera del centro germinal, y explicaría la ausencia casi por completo de este gen en neoplasias con su origen en células B más maduras como el MM y

la MW.^{18,36} Además, esta información podría resultar útil en el momento del diagnóstico para distinguir entre un LDCBG derivado de la transformación histológica de un LF y un verdadero LDCBG *de novo*, siendo necesario un análisis previo en una cohorte de tamaño superior para confirmar esta relación. En conjunto, estos hallazgos sugieren la participación de ciertos antígenos en la linfomagénesis del LF a través de la estimulación de la expresión de Igs de superficie codificadas por genes IGHV específicos.

Por otro lado, se analizó la influencia del uso de genes IGHV e HMS en la evolución clínica de los pacientes con LF, teniendo en consideración la inclusión de varios esquemas terapéuticos de R-IQT como una potencial limitación del presente estudio. No se observaron asociaciones significativas entre ninguno de los subgrupos o genes IGHV y el resultado clínico de los pacientes con LF. En este contexto, sólo se observaron hallazgos relevantes en los dos pacientes que expresaron el subgrupo IGHV5, que mostraron menor supervivencia en concordancia con estudios previos, aunque no fue suficiente para extraer conclusiones definitivas.¹³ Respecto a los genes IGHV, la variabilidad y baja tasa de selección observada en el LF impide extraer conclusiones fiables sobre su papel o importancia clínica, siendo necesario para ello su análisis en series mayores, posiblemente por encima de 1000 casos, como las recientemente publicadas en LLC y MM.^{22,42} Algo similar ocurre respecto al estado mutacional de IGHV, dado que sólo cuatro casos mostraron un patrón no mutado de IGHV, de acuerdo a lo reportado previamente en otras series.^{30,43} Los cuatro pacientes no mutados presentaron peor pronóstico y menor supervivencia que el resto de pacientes con HMS. Una revisión en profundidad descartó la presencia de neoplasias de célula B madura concomitantes.

De forma novedosa, en el presente trabajo se analizó por primera vez el papel de los genes IGHV en la transformación histológica del LF a linfoma agresivo, mediante el análisis de 47 pacientes con muestra pareadas en el momento del diagnóstico (LF) y transformación (LFt). En primer lugar, se confirmó la relación clonal entre cada pareja de muestras, descartando del análisis dos pacientes (4%) que presentaron distintos reordenamientos en la biopsia del diagnóstico y de la transformación, que indica la presencia en estos casos de un LDCBG secundario no clonalmente relacionado. Por tanto, de la serie global de pacientes con LF, 45 casos (24%) experimentaron TH a linfoma agresivo, con relación clonal confirmada entre ambas biopsias. Se observó un riesgo de TH a 10 años significativamente mayor en aquellos pacientes que no recibieron tratamiento durante su etapa indolente respecto a los pacientes que fueron tratados como LF sintomático. Esto sugiere una asociación del tratamiento precoz con menor riesgo de TH en concordancia con los resultados de estudios recientes.^{9,44}

El hallazgo más relevante fue el potencial papel biológico del gen IGHV3-48 en la transformación a linfoma agresivo, asociado con riesgo de TH de forma independiente en el análisis multivariante. Además, este gen se mostró sobrerrepresentado en el LFt en comparación con el grupo de pacientes con LF sin TH a 5 años,

eligiendo este umbral por su proximidad a la mediana de tiempo hasta la transformación (4.4 años) y por haber sido previamente utilizado en otras series.⁴⁵ No se observó un sesgo en la frecuencia de este gen respecto a series previamente publicadas en LF.^{13;26;30} Recientemente, el uso de rituximab en primera línea de tratamiento en el LF se ha visto asociado con un riesgo reducido de TH.⁴⁴ A pesar de ello, el rituximab no pareció tener efecto protector en los casos que expresaron el gen IGHV3-48, ya que la mayoría de ellos recibieron esquemas de R-IQT. Además, los casos que expresaron el gen IGHV3-48 no presentaron una peor supervivencia, probablemente debido a que varios de estos pacientes pudieron rescatarse mediante terapias con rituximab seguido de trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos (auto-TPH) para tratar la transformación. Por tanto, estos hallazgos indican que el gen IGHV3-48 funciona como un factor patogénico implicado en transformación, similar a lo que ocurre con el gen IGHV4-39 en la progresión de la LLC a síndrome de Richter.⁴⁶

En resumen, se observó un sesgo en el uso de genes IGHV involucrados en el reordenamiento V(D)J clonal en la serie más grande de LF descrita hasta la fecha. En los pacientes con LF, la selección del gen IGHV3-48 parece tener un papel en la transformación maligna del LF a linfoma agresivo, que sugiere su estudio como biomarcador predictivo de TH. Por otro lado, tanto el gen IGHV3-30 como el IGHV4-34 podrían contribuir en el diagnóstico diferencial entre los LDCBG de nuevo diagnóstico y aquellos procedentes de una TH de LF. Teniendo en cuenta estos resultados, la selección antigénica parece mostrar un papel biológico en el desarrollo y transformación del LF, ofreciendo nuevas opciones en la investigación de la biología del LFt.

BIBLIOGRAFÍA

1. Salles G, Seymour JF, Offner F et al. Rituximab maintenance for 2 years in patients with high tumour burden follicular lymphoma responding to rituximab plus chemotherapy (PRIMA): a phase 3, randomised controlled trial. *Lancet* 2011;377:42-51.
2. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Revised 4th Edition.: IARC Press; 2017.
3. Lackraj T, Goswami R, Kridel R. Pathogenesis of follicular lymphoma. *Best.Pract.Res.Clin.Haematol.* 2018;31:2-14.
4. Casulo C, Byrtek M, Dawson KL et al. Early Relapse of Follicular Lymphoma After Rituximab Plus Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine, and Prednisone Defines Patients at High Risk for Death: An Analysis From the National LymphoCare Study. *J.Clin.Oncol.* 2015;33:2516-2522.
5. Flinn IW, van der JR, Kahl BS et al. Randomized trial of bendamustine-rituximab or R-CHOP/R-CVP in first-line treatment of indolent NHL or MCL: the BRIGHT study. *Blood* 2014;123:2944-2952.
6. Casulo C, Burack WR, Friedberg JW. Transformed follicular non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 2015;125:40-47.
7. Fischer T, Zing NPC, Chiattoni CS, Federico M, Luminari S. Transformed follicular lymphoma. *Ann.Hematol.* 2018;97:17-29.
8. Alcoceba, M., Alonso-Alvarez, S., García-Álvarez, M, Martín, A, and Caballero, M. D. Unmet needs in histological transformation of follicular lymphoma: a clinical and biological review. *Ann.Lymphoma* 1. 21-11-2017.
9. Alonso-Alvarez S, Magnano L, Alcoceba M et al. Risk of, and survival following, histological transformation in follicular lymphoma in the rituximab era. A retrospective multicentre study by the Spanish GELTAMO group. *Br.J.Haematol.* 2017;178:699-708.
10. Montoto S, Davies AJ, Matthews J et al. Risk and clinical implications of transformation of follicular lymphoma to diffuse large B-cell lymphoma. *J.Clin.Oncol.* 2007;25:2426-2433.
11. Solal-Celigny P, Roy P, Colombat P et al. Follicular lymphoma international prognostic index. *Blood* 2004;104:1258-1265.
12. Federico M, Bellei M, Marcheselli L et al. Follicular lymphoma international prognostic index 2: a new prognostic index for follicular lymphoma developed by the international follicular lymphoma prognostic factor project. *J.Clin.Oncol.* 2009;27:4555-4562.
13. Berget E, Molven A, Lokeland T, Helgeland L, Vintermyr OK. IGHV gene usage and mutational status in follicular lymphoma: Correlations with prognosis and patient age. *Leuk.Res.* 2015;39:702-708.
14. Damle RN, Wasil T, Fais F et al. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999;94:1840-1847.
15. Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999;94:1848-1854.
16. Tobin G, Thunberg U, Johnson A et al. Somatic mutated Ig V(H)3-21 genes characterize a new subset of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002;99:2262-2264.
17. Camacho FI, Algara P, Rodriguez A et al. Molecular heterogeneity in MCL defined by the use of specific VH genes and the frequency of somatic mutations. *Blood* 2003;101:4042-4046.
18. Martín-Jimenez P, Garcia-Sanz R, Balanzategui A et al. Molecular characterization of heavy chain immunoglobulin gene rearrangements in Waldenström's macroglobulinemia and IgM monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Haematologica* 2007;92:635-642.

19. Zuckerman NS, McCann KJ, Ottensmeier CH et al. Ig gene diversification and selection in follicular lymphoma, diffuse large B cell lymphoma and primary central nervous system lymphoma revealed by lineage tree and mutation analyses. *Int.Immunol.* 2010;22:875-887.
20. Sebastian E, Alcoceba M, Balanzategui A et al. Molecular characterization of immunoglobulin gene rearrangements in diffuse large B-cell lymphoma: antigen-driven origin and IGHV4-34 as a particular subgroup of the non-GCB subtype. *Am.J.Pathol.* 2012;181:1879-1888.
21. Brisou G, Verney A, Wenner T et al. A restricted IGHV gene repertoire in splenic marginal zone lymphoma is associated with autoimmune disorders. *Haematologica* 2014;99:e197-e198.
22. Ghia EM, Jain S, Widhopf GF et al. Use of IGHV3-21 in chronic lymphocytic leukemia is associated with high-risk disease and reflects antigen-driven, post-germinal center leukemogenic selection. *Blood* 2008;111:5101-5108.
23. Baliakas P, Agathangelidis A, Hadzidimitriou A et al. Not all IGHV3-21 chronic lymphocytic leukemias are equal: prognostic considerations. *Blood* 2015;125:856-859.
24. Bahler DW, Campbell MJ, Hart S et al. Ig VH gene expression among human follicular lymphomas. *Blood* 1991;78:1561-1568.
25. Noppe SM, Heirman C, Bakkus MH et al. The genetic variability of the VH genes in follicular lymphoma: the impact of the hypermutation mechanism. *Br.J.Haematol.* 1999;107:625-640.
26. Aarts WM, Bende RJ, Steenbergen EJ et al. Variable heavy chain gene analysis of follicular lymphomas: correlation between heavy chain isotype expression and somatic mutation load. *Blood* 2000;95:2922-2929.
27. Lynch RC, Gratzinger D, Advani RH. Clinical Impact of the 2016 Update to the WHO Lymphoma Classification. *Curr.Treat.Options.Oncol.* 2017;18:45.
28. Hsu FJ, Levy R. Preferential use of the VH4 Ig gene family by diffuse large-cell lymphoma. *Blood* 1995;86:3072-3082.
29. Rosenquist R, Lindstrom A, Holmberg D, Lindh J, Roos G. V(H) gene family utilization in different B-cell lymphoma subgroups. *Eur.J.Haematol.* 1999;62:123-128.
30. Catherwood MA, Gonzalez D, Patton C et al. Improved clonality assessment in germinal centre/post-germinal centre non-Hodgkin's lymphomas with high rates of somatic hypermutation. *J.Clin.Pathol.* 2007;60:524-528.
31. Brezinschek HP, Foster SJ, Brezinschek RI et al. Analysis of the human VH gene repertoire. Differential effects of selection and somatic hypermutation on human peripheral CD5(+)/IgM+ and CD5(-)/IgM+ B cells. *J.Clin.Invest* 1997;99:2488-2501.
32. Hadzidimitriou A, Agathangelidis A, Darzentas N et al. Is there a role for antigen selection in mantle cell lymphoma? Immunogenetic support from a series of 807 cases. *Blood* 2011;118:3088-3095.
33. Agathangelidis A, Darzentas N, Hadzidimitriou A et al. Stereotyped B-cell receptors in one-third of chronic lymphocytic leukemia: a molecular classification with implications for targeted therapies. *Blood* 2012;119:4467-4475.
34. Zibellini S, Capello D, Forconi F et al. Stereotyped patterns of B-cell receptor in splenic marginal zone lymphoma. *Haematologica* 2010;95:1792-1796.
35. Arons E, Roth L, Sapolsky J et al. Evidence of canonical somatic hypermutation in hairy cell leukemia. *Blood* 2011;117:4844-4851.
36. Gonzalez D, van der BM, Garcia-Sanz R et al. Immunoglobulin gene rearrangements and the pathogenesis of multiple myeloma. *Blood* 2007;110:3112-3121.
37. Wu YC, Kipling D, Leong HS et al. High-throughput immunoglobulin repertoire analysis distinguishes between human IgM memory and switched memory B-cell populations. *Blood* 2010;116:1070-1078.

38. Martin-Jimenez P, Garcia-Sanz R, Gonzalez D et al. Molecular characterization of complete and incomplete immunoglobulin heavy chain gene rearrangements in hairy cell leukemia. *Clin.Lymphoma Myeloma*. 2007;7:573-579.
39. Ghia P, Stamatopoulos K, Belessi C et al. Geographic patterns and pathogenetic implications of IGHV gene usage in chronic lymphocytic leukemia: the lesson of the IGHV3-21 gene. *Blood* 2005;105:1678-1685.
40. Lossos IS, Alizadeh AA, Eisen MB et al. Ongoing immunoglobulin somatic mutation in germinal center B cell-like but not in activated B cell-like diffuse large cell lymphomas. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2000;97:10209-10213.
41. Ruminy P, Etancelin P, Couronne L et al. The isotype of the BCR as a surrogate for the GCB and ABC molecular subtypes in diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia* 2011;25:681-688.
42. Alejandro Medina, Cristina Jimenez, M.Eugenia Sarasquete et al. VDJH Gene Repertoire Analysis in Multiple Myeloma (MM) Patients: Correlation with Clinical Data. [abstract]. - 18 A.D.;
43. Stamatopoulos K, Kosmas C, Papadaki T et al. Follicular lymphoma immunoglobulin kappa light chains are affected by the antigen selection process, but to a lesser degree than their partner heavy chains. *Br.J.Haematol*. 1997;96:132-146.
44. Federico M, Caballero B, Marcheselli L et al. Rituximab and the risk of transformation of follicular lymphoma: a retrospective pooled analysis. *Lancet Haematol*. 2018;5:e359-e367.
45. Kridel R, Mottok A, Farinha P et al. Cell of origin of transformed follicular lymphoma. *Blood* 2015;126:2118-2127.
46. Rossi D, Cerri M, Capello D et al. Biological and clinical risk factors of chronic lymphocytic leukaemia transformation to Richter syndrome. *Br.J.Haematol*. 2008;142:202-215.

MATERIAL SUPLEMENTARIO - Tablas Suplementarias:

Tabla Suplementaria S1. Características clínico-biológicas de la serie global de pacientes con LF incluidos (serie global, n=187) vs. casos con LF y reordenamiento IGH clonal disponible (serie clonal, n=138).

Variable	Serie global, n (%)	Serie clonal, n (%)	P
Mediana de seguimiento, meses (intervalo)	79 (1-257)	80.5 (3-256)	ns
Edad, años (mediana, intervalo)	58 (19-87)	59 (19-87)	ns
Sexo M/H	99 (53)/88 (47)	79 (57)/59 (43)	ns
Grado histológico*			
1	84 (48.8)	60 (44.8)	ns
2	67 (39)	58 (43.3)	ns
3A	21 (12.2)	12 (9.0)	ns
FLIPI*			
0-1 (Bajo riesgo)	49 (32.9)	32 (27.4)	ns
2 (Riesgo intermedio)	46 (30.9)	39 (33.3)	ns
3-5 (Alto riesgo)	54 (36.2)	46 (39.3)	ns
Ann Arbor*			
I	24 (14.2)	12 (9.2)	ns
II	18 (10.7)	13 (10.0)	ns
III	18 (10.7)	14 (10.8)	ns
IV	109 (64.5)	91 (70.0)	ns
Terapia en primera línea			
Nunca tratados	24 (12.8)	16 (11.6)	ns
IQT basada en rituximab	98 (52.4)	80 (58.0)	ns
R-CHOP	68 (69.4)	53 (66.3)	ns
R-Bendamustina	11 (11.2)	8 (10.0)	ns
R-CVP	3 (3.1)	3 (3.7)	ns
Otros	16 (16.3)	16 (20.0)	ns
QT sin rituximab	48 (25.7)	34 (24.6)	ns
CHOP	35 (72.9)	25 (73.5)	ns
Basados en fludarabina	3 (6.3)	2 (5.9)	ns
Otros	10 (20.8)	7 (20.6)	ns
Radioterapia sola o con rituximab	13 (7)	6 (4.3)	ns
Rituximab en monoterapia	4 (2.1)	2 (1.4)	ns
Mantenimiento con rituximab*	73 (39)	60 (54.1)	ns
Respuesta tras inducción			
RC	87 (53.7)	61 (50.4)	ns
RP	63 (38.9)	51 (42.1)	ns
NR/Progresión	12 (7.4)	9 (7.4)	ns
CR30*	80 (53)	58 (51.3)	ns
FT a 5 años (SLFT)*	74 (49.8)	55 (50.4)	ns
Exitus a 5 años (SG)	31 (81.9)	26 (80)	ns

*Serie global: Dato grado histológico disponible para 172 (92%) pacientes; FLIPI para 149 (80%); Ann Arbor para 169 (90%); Mantenimiento calculado para 147 (79%); CR30 para 151 (81%) y SLFT para 158 (84%). Serie clonal: Dato grado histológico disponible para 130 (94%) pacientes; FLIPI disponible 117 (85%); Ann Arbor para 130 (94%); Mantenimiento calculado para 111 (80%); CR30 para 113 (82%) y SLFT para 117 (85%).

Tabla Suplementaria S2. Frecuencias de los subgrupos IGHV, IGHD e IGHJ de los pacientes con linfoma folicular y reordenamiento V(D)J clonal (n=138).

Subgrupo IGHV	Frecuencia		Subgrupo IGHD	Frecuencia		Subgrupo IGHJ	Frecuencia	
	n	%		n	%		n	%
IGHV1	7	5.1	IGHD1	12	9.6	IGHJ1	1	0.8
IGHV2	4	2.9	IGHD2	31	24.8	IGHJ2	3	2.4
IGHV3	87	63.0	IGHD3	46	36.8	IGHJ3	15	11.9
IGHV4	37	26.8	IGHD4	15	12.0	IGHJ4	60	47.6
IGHV5	2	1.4	IGHD5	5	4.0	IGHJ5	22	17.5
IGHV6	1	0.7	IGHD6	16	12.8	IGHJ6	25	19.8
IGHV7	0	0.0	IGHD7	0	0.0	-	-	-
Total	138	100.0	Total	125	100.0	Total	126	100.0

Tabla Suplementaria S3. Repertorio de genes IGHV y su frecuencia en los pacientes con linfoma folicular y reordenamiento V(D)J clonal (n=138).

Gen IGHV	Frecuencia		Gen IGHV	Frecuencia		Gen IGHV	Frecuencia	
	n	%		n	%		n	%
IGHV1-2	0	0.0	IGHV3-30	13	9.4	IGHV4-38-2	0	0.0
IGHV1-3	0	0.0	IGHV3-30-3	1	0.7	IGHV4-39	6	4.3
IGHV1-8	1	0.7	IGHV3-30-5	0	0.0	IGHV4-55	1	0.7
IGHV1-18	2	1.4	IGHV3-33	5	3.6	IGHV4-59	1	0.7
IGHV1-24	0	0.0	IGHV3-43	0	0.0	IGHV4-61	5	3.6
IGHV1-45	0	0.0	IGHV3-43D	0	0.0	IGHV5-10-1	1	0.7
IGHV1-46	1	0.7	IGHV3-48	14	10.1	IGHV5-51	1	0.7
IGHV1-58	0	0.0	IGHV3-49	0	0.0	IGHV6-1	1	0.7
IGHV1-69	3	2.2	IGHV3-53	2	1.4	IGHV7-4-1	0	0.0
IGHV1-69-2	0	0.0	IGHV3-64	2	1.4	Total	138	100.0
IGHV1-69D	0	0.0	IGHV3-64D	0	0.0			
IGHV2-5	2	1.4	IGHV3-66	1	0.7			
IGHV2-26	1	0.7	IGHV3-72	1	0.7			
IGHV2-70	1	0.7	IGHV3-73	2	1.4			
IGHV2-70D	0	0.0	IGHV3-74	2	1.4			
IGHV3-7	6	4.3	IGHV3-NL1	0	0.0			
IGHV3-9	0	0.0	IGHV4-4	1	0.7			
IGHV3-11	3	2.2	IGHV4-28	0	0.0			
IGHV3-13	1	0.7	IGHV4-30	2	1.4			
IGHV3-15	4	2.9	IGHV4-30-1	0	0.0			
IGHV3-20	1	0.7	IGHV4-30-2	1	0.7			
IGHV3-21	10	7.2	IGHV4-30-4	0	0.0			
IGHV3-23	19	13.8	IGHV4-31	0	0.0			
IGHV3-23D	0	0.0	IGHV4-34	20	14.5			

Tabla Suplementaria S4. Frecuencias de los subgrupos IGHV, IGHD e IGHJ de los pacientes con linfoma folicular transformado y reordenamiento V(D) clonal (n=31).

Subgrupo IGH	Frecuencia		Subgrupo IGH	Frecuencia		Subgrupo IGH	Frecuencia	
	n	%		n	%		n	%
IGHV1	1	3.2	IGHD1	3	12.0	IGHJ1	0	0.0
IGHV2	0	0.0	IGHD2	8	32.0	IGHJ2	1	3.8
IGHV3	23	74.2	IGHD3	8	32.0	IGHJ3	3	11.5
IGHV4	6	19.4	IGHD4	2	8.0	IGHJ4	12	46.2
IGHV5	1	3.2	IGHD5	0	0.0	IGHJ5	4	15.4
IGHV6	0	0.0	IGHD6	4	16.0	IGHJ6	6	23.1
IGHV7	0	0.0	IGHD7	0	0.0	-	-	-
Total	31	100.0	Total	25	100.0	Total	26	100.0

Tabla Suplementaria S5. Repertorio de genes IGHV y su frecuencia en los pacientes con linfoma folicular transformado (LFt) y reordenamiento V(D) clonal (n=31).

Gen IGHV	Frecuencia		Gen IGHV	Frecuencia		Gen IGHV	Frecuencia	
	n	%		n	%		n	%
IGHV1-2	0	0.0	IGHV3-30	4	12.9	IGHV4-38-2	0	0.0
IGHV1-3	0	0.0	IGHV3-30-3	0	0.0	IGHV4-39	1	3.2
IGHV1-8	0	0.0	IGHV3-30-5	0	0.0	IGHV4-55	0	0.0
IGHV1-18	0	0.0	IGHV3-33	0	0.0	IGHV4-59	0	0.0
IGHV1-24	0	0.0	IGHV3-43	0	0.0	IGHV4-61	0	0.0
IGHV1-45	0	0.0	IGHV3-43D	0	0.0	IGHV5-10-1	0	0.0
IGHV1-46	0	0.0	IGHV3-48	6	19.4	IGHV5-51	1	3.2
IGHV1-58	0	0.0	IGHV3-49	0	0.0	IGHV6-1	0	0.0
IGHV1-69	1	3.2	IGHV3-53	0	0.0	IGHV7-4-1	0	0.0
IGHV1-69-2	0	0.0	IGHV3-64	0	0.0	Total	31	100.0
IGHV1-69D	0	0.0	IGHV3-64D	0	0.0			
IGHV2-5	0	0.0	IGHV3-66	0	0.0			
IGHV2-26	0	0.0	IGHV3-72	0	0.0			
IGHV2-70	0	0.0	IGHV3-73	1	3.2			
IGHV2-70D	0	0.0	IGHV3-74	1	3.2			
IGHV3-7	1	3.2	IGHV3-NL1	0	0.0			
IGHV3-9	0	0.0	IGHV4-4	0	0.0			
IGHV3-11	0	0.0	IGHV4-28	0	0.0			
IGHV3-13	1	3.2	IGHV4-30	0	0.0			
IGHV3-15	1	3.2	IGHV4-30-1	0	0.0			
IGHV3-20	0	0.0	IGHV4-30-2	0	0.0			
IGHV3-21	4	12.9	IGHV4-30-4	0	0.0			
IGHV3-23	4	12.9	IGHV4-31	0	0.0			
IGHV3-23D	0	0.0	IGHV4-34	5	16.1			

MATERIAL SUPLEMENTARIO - Figuras Suplementarias:

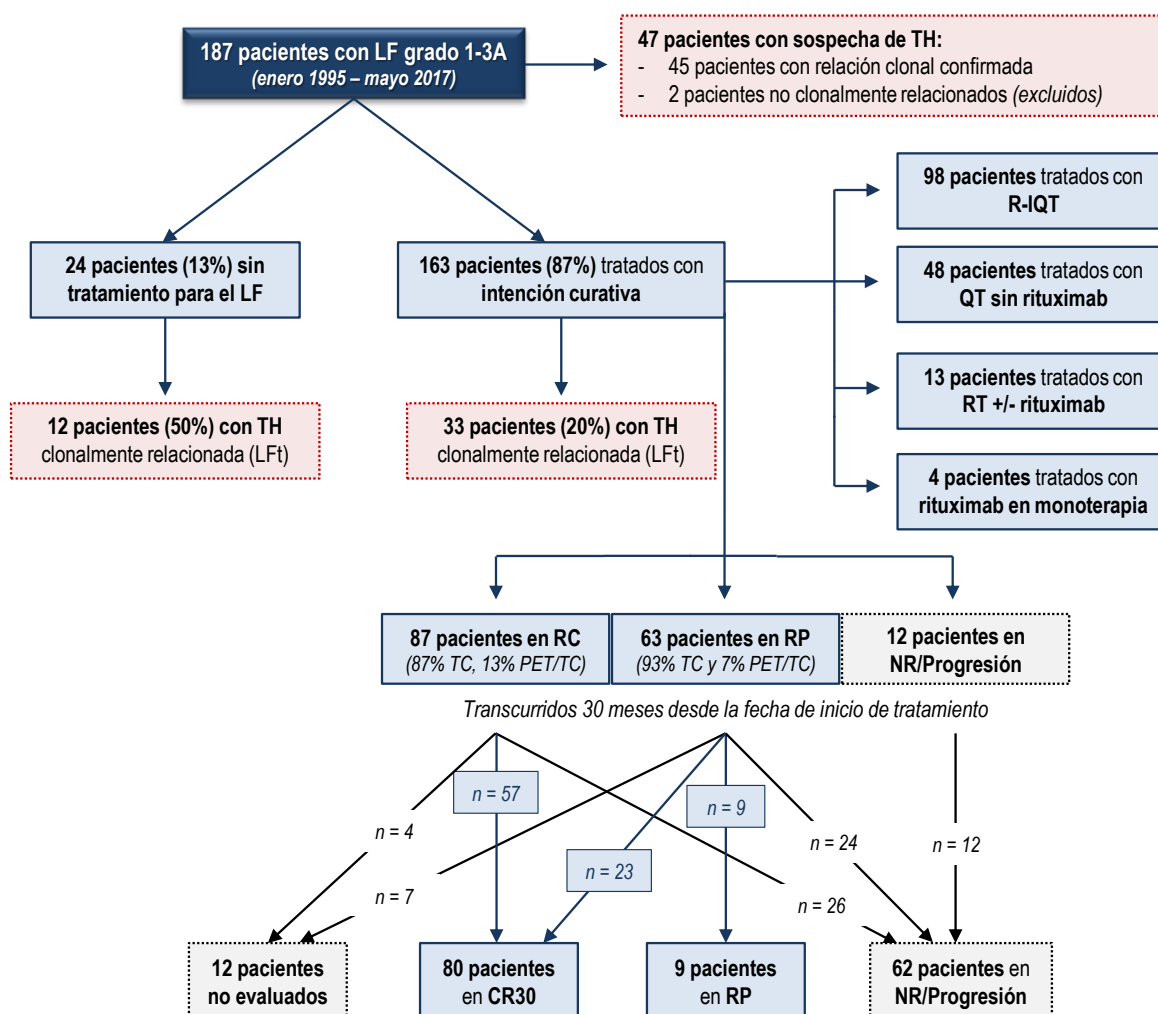


Figura Suplementaria S1. Diagrama de flujo que esquematiza la evolución clínica de los 187 pacientes con LF incluidos en el capítulo 1 de la presente tesis doctoral. CR30, respuesta completa a los 30 meses; LF, linfoma folicular; LFt, linfoma folicular transformado; NR, no respuesta; PET tomografía por emisión de positrones; QT, quimioterapia; R-IQT, inmunoterapia basada en rituximab; RC, respuesta completa; RP, respuesta parcial; RT, radioterapia; TC, tomografía computerizada; TH, transformación histológica.

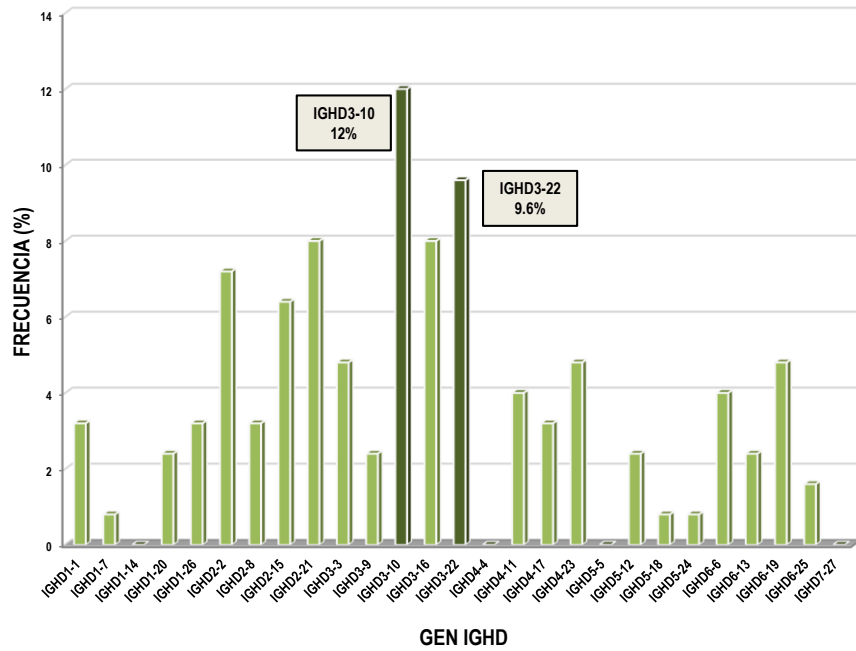


Figura Suplementaria S2. Repertorio de genes IGHD en el linfoma folicular (n=125). Los genes IGHD identificados en la serie de pacientes con reordenamiento V(D)J clonal se representan a lo largo del eje X del gráfico de barras.

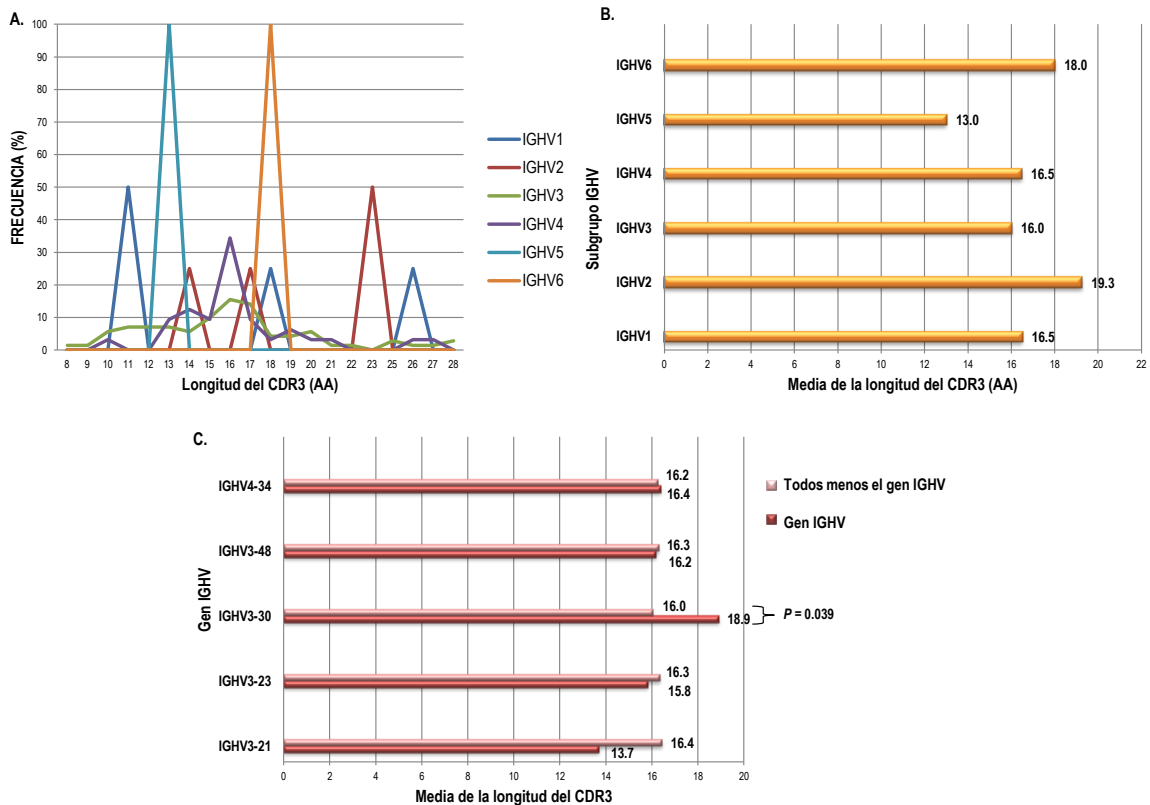


Figura Suplementaria S3. Distribución de la longitud del CDR3 para los distintos subgrupos IGHV y genes más frecuentes en linfoma folicular (n=113). (A) Diagrama de líneas que representa la longitud en aminoácidos (AA) del CDR3 en número absoluto de las 130 secuencias analizadas y agrupadas en función del subgrupo IGHV. (B) Representación de la media de la longitud del CDR3 en AA para cada subgrupo IGHV. (C) Representación de la media de la longitud del CDR3 en AA para cada uno de los genes IGHV más frecuentes en comparación con la media de la longitud del CDR3 de todos los genes menos el más frecuente en cada caso. Se observan diferencias significativas en el caso del gen IGHV3-30 ($P=0.039$).

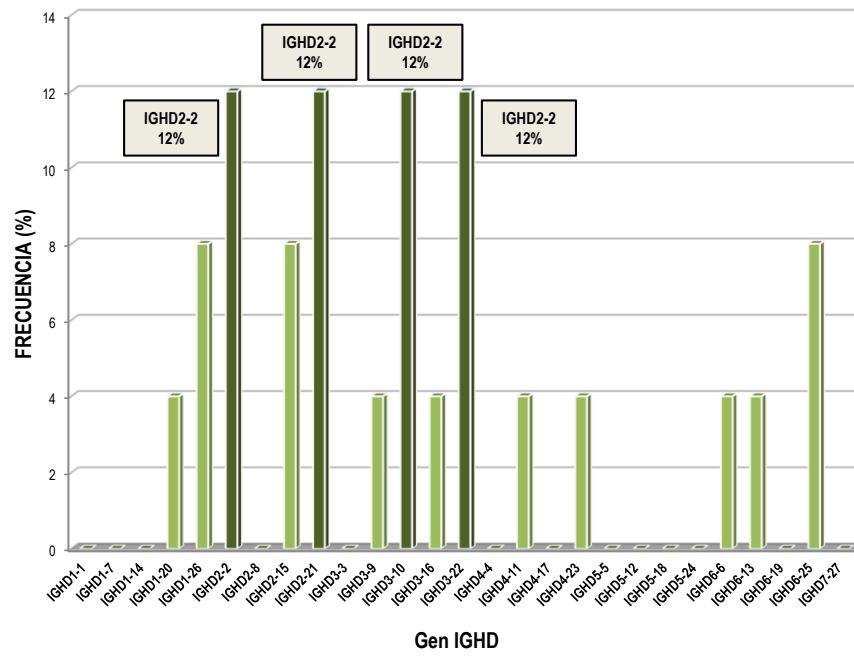


Figura Suplementaria S4. Repertorio de genes IGHD en el linfoma folicular transformado (n=25). Los genes IGHD identificados en la serie de pacientes con reordenamiento V(D)J clonal se representan a lo largo del eje X del gráfico de barras.

CAPÍTULO 2

Caracterización genómica de pacientes con linfoma folicular. Identificación de alteraciones génicas asociadas con la evolución clínica y aplicación del m7-FLIPI en nuestra serie.

RESUMEN

Introducción: El linfoma folicular (LF) continúa siendo una enfermedad incurable, a pesar de la mejora de sus resultados con la introducción del anticuerpo anti-CD20 rituximab. Por ello, son claves los modelos de riesgo que permiten la estratificación pronóstica de los pacientes, como es el índice pronóstico FLIPI. Sin embargo, sigue habiendo pacientes que progresan precozmente (< 24 meses tras inducción), incluyendo algunos clasificados en el grupo de bajo riesgo según este índice. La combinación de factores clínicos con marcadores genéticos podría mejorar la estratificación de los pacientes con LF. Pese a que se conoce el perfil mutacional del LF, su impacto clínico ha sido escasamente analizado, siendo en la mayoría estudios de genes aislados y, en muchas ocasiones, con resultados discordantes. Recientemente se ha propuesto un modelo pronóstico de riesgo clínico-genético denominado m7-FLIPI, que integra el estado mutacional de 7 genes (*EZH2*, *ARID1A*, *MEF2B*, *EP300*, *FOXO1*, *CREBBP*, *CARD11*) con variables clínico-biológicas básicas (FLIPI, ECOG), y permite identificar pacientes con alto riesgo de fracaso terapéutico. Sin embargo, el m7-FLIPI no es capaz de discernir con precisión aquellos pacientes con progresión precoz, siendo además poco reproducible y escasamente validado a día de hoy.

Objetivos: El objetivo del presente capítulo fue estudiar el perfil mutacional del LF y su impacto pronóstico en la evolución de pacientes no seleccionados con diagnóstico de LF y tratados con R-QT como primera línea de tratamiento. Se analizó su asociación con supervivencia libre de fracaso terapéutico (SLFT) a 5 años, respuesta completa (RC) a los 30 meses desde el inicio de tratamiento y supervivencia global (SG), además de su papel en el riesgo de transformación histológica (TH).

Pacientes y métodos: Se incluyeron 83 pacientes con muestra tumoral en el momento del diagnóstico, 47 de los cuales recibieron esquemas de R-IQT. De cada paciente se incluyó una muestra no tumoral pareada con el objetivo de excluir las variantes presentes en la línea germinal. Se estudió la región codificante de 66 genes descritos en patologías linfoides mediante dos paneles de secuenciación masiva de diseño propio, comparables entre sí. La secuenciación, análisis primario y análisis secundario se realizaron en un MiSeq (Illumina Inc.), y la anotación y filtrado de variantes se llevó a cabo con el software *BaseSpace Variant Interpreter*

(Illumina Inc.). Sólo se consideraron las variantes con más de 100 lecturas y una frecuencia mínima de lecturas con la variante (VAF) del 5%.

Resultados: Se detectaron 548 variantes somáticas en 56 de los 66 genes analizados (84.8%), 14 de los cuales se vieron alterados en más del 10% de los pacientes (*CREBBP* 63.9% [n=53], *KMT2D* 55.4% [46], *BCL2* 41% [34], *TNFRSF14* 27.7% [23], *EZH2* 22.9% [19], *STAT6* 19.3% [12], *ARID1A* 18.1% [15], *FOXO1* 18.1% [15], *CARD11* 14.5% [12], *EP300* 14.5% [12], *GNA13* 13.2% [11], *IRF8* 12% [10], *SMARCA4* 12% [10] y *HIST1H1E* 10.8% [9]), siendo las categorías funcionales más frecuentemente alteradas *modificación epigenética* (96.4%), *señalización* (66.3%) y *factores de transcripción* (49.4%). Al analizar el impacto pronóstico del m7-FLIPI en aquellos pacientes tratados con R-IQT, no se observaron diferencias significativas en SLFT ni en SG en este grupo de pacientes. Sin embargo, cabe destacar que la presencia de 6 o más genes alterados se asoció con ausencia de CR30 (28.6% vs. 82.6%, $P < 0.01$), SLFT más corta a 5 años (30% vs. 82%, $P < 0.001$) y menor SG a 10 años (49% vs. 76%, $P < 0.05$), de manera independiente al FLIPI. Además, las mutaciones en el gen *EZH2* se asociaron a mayor proporción de CR30 (100% vs. 53.3%, $P < 0.05$), mientras que los pacientes con alteraciones en *FOXO1* presentaron una SLFT a 5 años significativamente menor que el resto (25% vs. 68%, $P < 0.05$). Ninguna de las variables clínico-biológicas mostró asociación significativa con riesgo de TH a 10 años.

Discusión y conclusiones: Como resultado del estudio, se observó un sesgo en el perfil mutacional del LF a favor de los genes involucrados en epigenética, señalización y codificantes de factores de transcripción. Todos ellos tienen un importante papel en el mantenimiento del programa genético de la célula B centro germinal (CG), en línea con lo descrito en estudios previos. A pesar de que el m7-FLIPI no predijo SLFT a 5 años en esta serie, probablemente por la inclusión de un menor número de pacientes en comparación con la serie original, la complejidad génica, definida por la presencia de alteraciones en 6 o más genes, mostró un importante papel en SLFT y SG, hecho que concuerda con lo descrito sobre alteraciones en el número de copias en LF. Además, las alteraciones en los genes *EZH2* y *FOXO1* también confirmaron su importancia en la evolución clínica de los pacientes, en línea con lo descrito previamente en LF.

En conclusión, el presente trabajo amplía los conocimientos en la patogenia del LF y confirma la dependencia de la célula tumoral de las alteraciones en reguladores epigenéticos, señalización y factores de transcripción. El hallazgo más relevante del estudio fue la asociación entre el aumento de la complejidad génica y/o la presencia de mutaciones en el gen *FOXO1* con una menor frecuencia de CR30, peor SLFT y menor SG en una serie de pacientes tratados homogéneamente, pudiendo discernir un subgrupo de mal pronóstico independientemente del índice FLIPI. La confirmación de estos resultados en una cohorte mayor e independiente permitiría desarrollar nuevos modelos predictores de riesgo para mejorar la estratificación de los pacientes con LF y desarrollar estrategias terapéuticas adaptadas al riesgo.

INTRODUCCIÓN

El linfoma folicular (LF) se caracteriza por presentar un curso clínico variable ya que, a pesar de la introducción del rituximab y de la elevada tasa de respuestas a su administración en primera línea, aproximadamente el 20% de los pacientes sufren progresión temprana o desarrollan enfermedad resistente en los 24 primeros meses (POD24, *early progression of disease*).¹⁻⁴ Además, una proporción no bien definida de pacientes experimenta transformación histológica (TH) a linfoma agresivo (LFt), principalmente linfoma difuso de célula B grande (LDCBG), suponiendo un pronóstico desfavorable para estos pacientes.⁵⁻⁸ Esta heterogeneidad clínica característica también se observa en su biología, ya que la patogénesis del LF implica multitud de cambios a nivel génico y genómico, y tiene lugar desde una traslocación cromosómica en etapas iniciales del LF, hasta una proliferación clonal de células malignas en etapas más desarrolladas.⁹⁻¹¹ Por ello, en las últimas décadas, se ha pretendido identificar marcadores biológicos que permitan reconocer el grupo de pacientes con alto riesgo de recaídas, resistencias y/o TH.

La incorporación de las técnicas de secuenciación masiva (NGS, por sus siglas en inglés) ha permitido en los últimos años conocer en mayor profundidad el perfil genómico del LF, implicando en su patogénesis genes codificantes de factores de transcripción (*STAT6*, *POU2F2*), genes involucrados en modulación de la respuesta inmune (*TNFRSF14*) y/o genes implicados en el desarrollo de la célula B (*EBF1*) entre otros,¹²⁻¹⁷ además de las lesiones clásicas en genes involucrados en regulación epigenética como *CREBBP*, *EP300*, *EZH2* y *KMT2D*.^{15;18-22} Sin embargo, el efecto de las alteraciones en estos genes en la evolución y resultados clínicos del paciente no se conoce bien actualmente.

En 2015, mediante un diseño de NGS que incluyó 74 genes, Pastore *et al.* identificaron 7 genes recurrentemente mutados (*EZH2*, *ARID1A*, *MEF2B*, *EP300*, *FOXO1*, *CREBBP* y *CARD11*) que, en combinación con el índice pronóstico clásico del LF (FLIPI)²³ y el estado funcional del paciente (ECOG), permitieron desarrollar un modelo de riesgo clínico-genético denominado m7-FLIPI. Este modelo identifica pacientes con alto riesgo de fracaso terapéutico con mayor eficiencia que el FLIPI,²⁴ de la misma forma que otros descritos basados en hallazgos clínicos o básicos de laboratorio como el FLIPI2²⁵ o el índice pronóstico PRIMA (PRIMA-PI),²⁶ recientemente descrito.

Por todo lo anterior, un mejor conocimiento de la patogénesis del LF es relevante para comprender el curso de esta enfermedad, desvelando así la complejidad que comprende este grupo de neoplasias. Por ello, el objetivo del presente estudio fue analizar el perfil mutacional y complejidad genética en una serie de pacientes con LF con el fin de analizar su papel en la evolución clínica de los pacientes.

RESULTADOS

1. Características de los pacientes

▪ Características clínico-biológicas

Se estudiaron 83 pacientes con LF de nuevo diagnóstico grado 1-3A confirmado histológicamente de acuerdo a la clasificación de la OMS de 2017,²⁷ diagnosticados entre enero de 2000 y diciembre de 2017 con muestra tumoral disponible en el momento del diagnóstico y su correspondiente pareada no tumoral. Los pacientes sin muestra tumoral disponible o con muestra disponible de mala calidad, baja concentración y/o baja infiltración por técnicas de citometría de flujo (<10%), no fueron incluidos. Además, tampoco lo fueron los pacientes con histología compuesta (LF+LDCBG) o LF grado 3B en el momento del diagnóstico.²⁸

La mediana de edad de los pacientes con LF incluidos en el presente capítulo fue 62.5 años (intervalo, 19-86), siendo mujeres el 55% de los casos (n=46). La mitad de la serie (51%) presentó grado 2 en el momento del diagnóstico, siendo minoritario el grupo de pacientes con grado 3A (n=9, 11%). En cuanto a la distribución de pacientes con LF de acuerdo al índice pronóstico FLIPI, el 45% del total de casos (n=34) fueron clasificados en el grupo de alto riesgo, mientras que el 32% (n=24) se encontraron en el grupo de bajo riesgo en el momento del diagnóstico. El 63% de los pacientes presentaron estadio IV de Ann Arbor al ser diagnosticados, y 69 pacientes (83%) fueron positivos para la t(14;18) por FISH y/o *nested* PCR. Las características clínico-biológicas de la serie se detallan en la Tabla 1.

Del total de la serie, 10 pacientes (12%) no recibieron tratamiento para el LF hasta la fecha de último seguimiento o TH a linfoma agresivo, mientras que 4 pacientes (5%) recibieron cuidados paliativos sin recibir tratamiento curativo para el LF. Los 69 pacientes restantes (83%) recibieron tratamiento con intención curativa para el LF durante su enfermedad, siendo en su mayoría (47/69 pacientes, 68%) tratados con esquemas inmuoquimioterápicos basados en rituximab (R-IQT). Dentro de este grupo tratado con R-IQT, el tratamiento de elección en primera línea fue R-CHOP, aplicado en 33/47 pacientes (70%). El resto (n=22/69) fueron tratados con quimioterapia sin rituximab (n=13/22, 59%), radioterapia (RT) sola o en combinación con rituximab (n=6/22, 27%), o con rituximab en monoterapia (n=3/22, 14%). Tras finalizar el tratamiento de inducción en primera línea, 37 pacientes recibieron mantenimiento con rituximab en dosis 375 mg/m² cada dos meses durante dos años (Tabla 1).

Tabla 1. Características clínico-biológicas de los pacientes incluidos en el capítulo 2 (n=83).

Variable	Serie capítulo 2, n (%)
Edad, años (mediana, intervalo)	62.5 (19-86)
Sexo M/H	46 (55) / 37 (45)
Grado histológico*	
1	30 (38)
2	40 (51)
3A	9 (11)
FLIPI*	
0-1 (Bajo riesgo)	24 (32)
2 (Riesgo intermedio)	17 (22.7)
3-5 (Alto riesgo)	34 (45.3)
Ann Arbor*	
I	10 (14.1)
II	9 (12.7)
III	7 (9.9)
IV	45 (63.4)
Positivos para la t(14;18)	69 (83.1)
Terapia en primera línea	
Nunca tratados	10 (12)
Cuidados paliativos	4 (4.8)
IQT basada en rituximab	47 (56.6)
R-CHOP	33 (70.2)
R-Bendamustina	3 (6.4)
R-CVP	3 (6.4)
R-FC	4 (8.5)
R-Lenalidomida	4 (8.5)
QT sin rituximab	13 (15.7)
CHOP	11 (84.6)
Otros	2 (15.4)
Radioterapia sola o con rituximab	6 (7.2)
Rituximab en monoterapia	3 (3.6)
Mantenimiento con rituximab*	37 (61.7)

*Dato de grado histológico disponible para 79 (95%) pacientes; FLIPI disponible para 75 (90%) pacientes; Ann Arbor disponible para 71 (85%) pacientes; Mantenimiento calculado para 60 (72%) pacientes. CHOP, ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, prednisona; CVP, ciclofosfamida, vincristina, prednisona; FLIPI, Índice pronóstico internacional del LF; IQT, Inmunoquimioterapia; QT, Quimioterapia; R, rituximab.

▪ **Evolución clínica de la serie**

En la serie global de pacientes con LF, tras una mediana de seguimiento de 6 años (intervalo, 0.4-19.7 años) para los pacientes vivos, 19 pacientes murieron por causas relacionadas o ajenas al linfoma y 15 casos (18%) sufrieron transformación histológica (TH) a linfoma agresivo, con relación clonal confirmada mediante el estudio del reordenamiento V(D)J (BIOMED-2) o *breakpoint* de la t(14;18). La supervivencia global (SG) de la

serie a 5 y 10 años fue del 78% y 70%, respectivamente, y del 94% a 5 años para los pacientes clasificados como bajo riesgo según el índice pronóstico FLIPI ($P < 0.01$).

Dentro del grupo de pacientes que recibieron tratamiento ($n=69$), 37 pacientes alcanzaron respuesta completa (RC) tras la inducción (74% evaluadas por TC y 26% por PET/TC), 28 pacientes hicieron respuesta parcial (RP, 89% evaluadas por TC y 11% por PET/TC) y 3 casos (4%) progresaron o mantuvieron enfermedad estable tras el tratamiento, clasificados como no respuesta y/o progresión (NR/Progresión). El caso restante no completó la inducción debido a complicaciones ajenas al tratamiento para el LF. Transcurridos 30 meses desde la fecha de inicio del tratamiento en primera línea, 33 pacientes se encontraban en respuesta completa (CR30). La supervivencia libre de fracaso terapéutico (SLFT) a 5 y 10 años para los pacientes de la serie que recibieron tratamiento ($n=69$) fue del 62% y 43%, respectivamente. La evolución clínica de la serie se resume en la Figura suplementaria S1.

2. Calidad de la secuenciación masiva (NGS) y concordancia de estrategias

▪ Diseño de NGS mediante tecnología de amplicones

Se secuenció un total de 41 muestras correspondientes a 21 pacientes con LF con el panel de NGS basado en la tecnología de amplicones *TruSeq Custom Amplicon v1.5* (Illumina Inc.), que incluye la región codificante (CDS) de 56 genes, como se detalla en “Material y Métodos” (apartado 2.7.2). Las 41 muestras correspondieron al ADN tumoral extraído de 21 biopsias obtenidas en el momento del diagnóstico (2 médulas óseas y 19 adenopatías o masas), y al ADN no tumoral pareado en cada uno de los casos, extraído de 20 muestras de médula ósea (MO) o sangre periférica (SP) no infiltradas por técnicas de citometría de flujo. No se pudo tener muestra no tumoral pareada en un caso porque el paciente falleció de forma precoz.

Estas 41 muestras fueron secuenciadas en 6 carreras de 8 muestras cada una, con una densidad media de 937 Kclusters/mm² generados en la secuenciación, de los cuales el 91.1% superaron los filtros de calidad propios de la plataforma de secuenciación. Como consecuencia, de una media de 22 millones de lecturas generadas, el 96.6% superaron los filtros de calidad de la plataforma de secuenciación y una media del 90.9% de las lecturas alineadas con el genoma de referencia presentaron un *Q score* en la escala de *Phred* mayor de 30 (*Q30*, precisión 99.9%). Se obtuvo una profundidad de cobertura media de 2999x (intervalo, 101x-25729x), filtrando durante el análisis todas las variantes con una profundidad de cobertura por debajo de 100x.

Mediante esta estrategia de amplicones, se llevó a cabo la secuenciación masiva del ADN de 4 muestras de SP de controles sanos jóvenes, con el objetivo de detectar los artefactos derivados de la síntesis y sucesivas amplificaciones que comprende dicha tecnología. Se observaron variantes en la región codificante de los genes

NOTCH2 y *KMT2D*, idénticas en las cuatro muestras, con una profundidad de cobertura media de 2827x (intervalo, 1200x-21492x). Estas variantes fueron observadas de forma aleatoria en las 41 muestras secuenciadas mediante la tecnología de amplicones y fueron descartadas en el análisis de todas ellas.

▪ **Diseño de NGS mediante tecnología de captura**

Con el panel de NGS basado en la tecnología de captura *SeqCap EZ Choice Enrichment* (Roche NimbleGen Inc.), que incluye la región codificante (CDS) de 66 genes (apartado 2.7.3 de “Material y Métodos”), se secuenció un total de 119 muestras correspondientes a 62 pacientes con LF. Las 119 muestras correspondieron al ADN tumoral extraído de 62 biopsias obtenidas el momento del diagnóstico (4 MO, 2 SP, 41 adenopatías o masas, 12 tejido parafinado y 3 otros tejidos), y al ADN no tumoral pareado en cada uno de los casos, extraído de 57 muestras de médula ósea (MO) o sangre periférica (SP) no infiltradas por técnicas de citometría de flujo. En cinco casos no se pudo tener muestra no tumoral pareada porque los pacientes fallecieron de forma precoz.

Estas 119 muestras fueron secuenciadas en 19 carreras de 8-12 muestras cada una, con una densidad media de 1027 Kclusters/mm² generados en la secuenciación, de los cuales el 93.1% superaron los filtros de calidad propios de la plataforma de secuenciación. Como consecuencia, de una media de 24.6 millones de lecturas generadas, el 97.7% superaron los filtros de calidad de la plataforma de secuenciación y una media del 96.6% de las lecturas alineadas con el genoma de referencia presentaron un Q score en la escala de *Phred* mayor de 30 (Q30, precisión 99.9%). Se obtuvo una profundidad de cobertura media de 914x (intervalo, 121x-3602x), filtrando durante el análisis todas las variantes con una profundidad de cobertura por debajo de 100x. Además, se observó una profundidad de cobertura por encima de 50x en el 99% de las regiones diana, siendo la uniformidad de cobertura media del 94.4% y el porcentaje medio de lecturas *on-target* o enriquecimiento del 82.6%.

▪ **Comparación y concordancia de tecnologías**

Se llevó a cabo la secuenciación masiva de 5 muestras de ADN extraído de biopsias de adenopatías mediante ambas tecnologías en paralelo siguiendo el protocolo correspondiente de preparación de librerías, como se detalló en los apartados 2.7.2 y 2.7.3 de “Material y Métodos”, y aplicando los parámetros de secuenciación correspondientes en cada caso. Estas muestras correspondieron a 3 pacientes con LF, incluidos en el presente capítulo, y 2 pacientes con LDCBG. Todas ellas presentaron buena calidad, integridad y elevada concentración e infiltración tumoral por técnicas de citometría de flujo.

Los resultados obtenidos a partir de ambos diseños y tecnologías se analizaron en paralelo aplicando los mismos filtros, teniendo en cuenta las variantes en región codificante con más de 100 lecturas totales y con una frecuencia de la variante alterada (VAF) por encima del 5%. Un resumen de los resultados y variantes detectadas en cada uno de los casos se refleja en la Tabla suplementaria S1.

Tras eliminar los artefactos, observados en frecuencias bajas, y repetidos entre las distintas muestras secuenciadas mediante el diseño de amplicones, se detectaron 24 variantes no sinónimas mediante esta tecnología. Las 24 variantes observadas fueron detectadas en frecuencias similares en los datos obtenidos en la secuenciación mediante tecnología de captura, siendo muy reducido el número de artefactos en este caso. Además, fueron identificadas 6 variantes mediante tecnología de captura que no fueron detectadas mediante amplicones (Tabla 2), demostrando una eficiencia limitada por parte de la tecnología de amplicones. Una revisión detallada de cada una de las regiones donde se encontraban estas 6 variantes, demostró que el diseño de amplicones tenía una cobertura mínima e, incluso, inexistente en ellas en comparación con la tecnología de captura, siendo en algunos casos regiones con alto contenido en GC y, por tanto, difíciles de amplificar. Por el contrario, no hubo ninguna variante detectada por tecnología de amplicones que no se observara mediante captura, confirmando que no se sobreestimó la frecuencia de ninguno de los genes analizados como consecuencia de la técnica.

La profundidad de cobertura media en la secuenciación mediante amplicones fue muy elevada, aproximadamente 2547x, pero altamente variable ya que la desviación estándar (SD) en este caso fue de 2726x (intervalo, 157x-10272x). Por el contrario, la tecnología de captura aportó menor profundidad de cobertura, pero suficientemente alta (~1378x) y mayor uniformidad entre las regiones secuenciadas (SD, 561x; intervalo, 338x-2574x) ($P < 0.05$). Además, todas las regiones estaban cubiertas casi en su totalidad.

Ante las limitaciones encontradas en la tecnología de amplicones, especialmente en cuanto a la abundancia de falsos positivos o artefactos y la menor sensibilidad de la técnica, además de ser incompatible con ADN fragmentado extraído de tejido parafinado, está justificado el cambio de estrategia, ya que los resultados obtenidos favorecen a la tecnología de captura. Los resultados entre ambas tecnologías fueron comparables, sin que se sobreestimara la frecuencia de alteraciones en ninguno de los genes estudiados. Esto permitió analizar de manera global todos los pacientes secuenciados independientemente de la tecnología utilizada. Aun así, se hizo un análisis más detallado en los 21 casos secuenciados por amplicones con ayuda del visor de secuencias IGV.

3. Perfil mutacional del LF

Tras llevar a cabo la anotación y filtrado de variantes, tanto por su calidad como por la frecuencia en la población (ver apartado 2.7.4 de “Material y Métodos), se detectaron 632 variantes no sinónimas en región codificante en los 83 pacientes con LF analizados. Del total de variantes, 84 fueron detectadas en las muestras no tumorales pareadas y fueron clasificadas como variantes germinales, siendo excluidas del análisis. Por tanto, se encontraron 548 variantes somáticas, de las cuales 385 (70.3%) fueron variantes de cambio de sentido o *missense*, 71 (13%) fueron ganancias de codón de *stop*, 69 (12.6%) fueron variantes con cambio de marco de lectura o *frameshift* (46 deleciones y 23 inserciones o duplicaciones), 17 (3.1%) fueron indels sin cambio de marco o *inframe* y 6 (1%) variantes afectaron al codón iniciador de la proteína (Figura 1). El conjunto de variantes somáticas presentó una VAF media de 28.6% (mediana, 26.8%; intervalo, 5%-85.8%), encontrándose 24 variantes con VAF por encima de 60% principalmente en los genes *CREBBP*, *KMT2D* y *TNFRSF14*, considerados eventos tempranos presentes en el clon iniciador del LF.²⁹⁻³¹

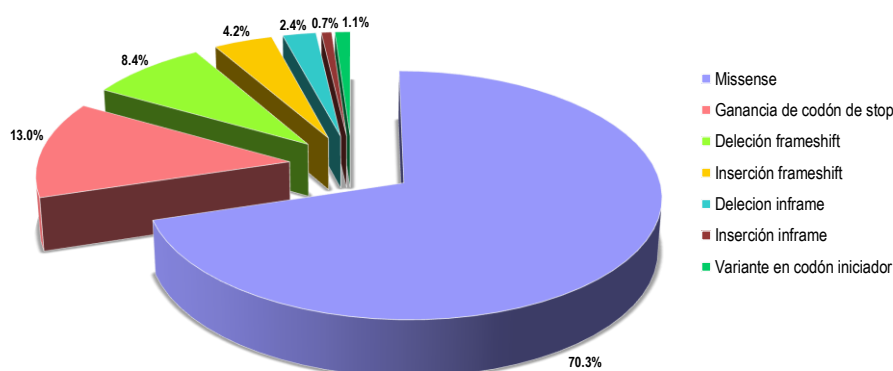


Figura 1. Diagrama circular que representa la clasificación de las 548 variantes somáticas identificadas en los 83 pacientes con LF analizados.

Las variantes somáticas detectadas afectaron a 56 de los 66 genes estudiados (84.8%), sin observar mutaciones en ninguno de los casos analizados en 10 genes: *CD58*, *CDKN2B*, *ID3*, *KRAS*, *MAML1*, *NRAS*, *P2RY8*, *RHOA*, *TCF3* y *XPO1*. De los genes analizados que presentaron mutaciones en su región codificante, 14 genes se observaron recurrentemente mutados (>10%) en los pacientes con LF estudiados (*CREBBP* 63.9% [n=53], *KMT2D* 55,4% [46], *BCL2* 41% [34], *TNFRSF14* 27,7% [23], *EZH2* 22.9% [19], *STAT6* 19.3% [12], *ARID1A* 18.1% [15], *FOXO1* 18.1% [15], *CARD11* 14.5% [12], *EP300* 14.5% [12], *GNA13* 13.2% [11], *IRF8* 12% [10], *SMARCA4* 12% [10] y *HIST1H1E* 10.8% [9], Figura 2). Se puede observar cómo la mitad de los genes frecuentemente alterados están involucrados en modificación de la cromatina o epigenética, incluyendo metiltransferasas, acetiltransferasas y genes codificantes de histonas, siendo *CREBBP* y *KMT2D* los más frecuentes, considerados eventos tempranos en la patogénesis en series no seleccionadas de LF.^{12;19;20;22;32}

Además, otros genes alterados en frecuencia elevada como *TNFRSF14*, *IRF8* y *STAT6* han sido reportados en varias ocasiones como recurrentemente alterados en LF.^{13;17;30;33;34} Sin embargo, en la serie de pacientes con LF analizada, sólo observamos alteraciones simultáneas en dos o más genes codificantes de histonas H1 en 2 casos, que presentaron alteraciones en *HIST1H1E* y además en *HIST1H1B* e *HIST1H1C*, respectivamente, a diferencia de lo descrito previamente.¹⁷

Una serie de alteraciones en estos genes recurrentemente mutados se vieron agrupadas en dominios o *hotspots* conocidos. Es el caso de *CREBBP*, gen que codifica una histona acetiltransferasa cuyas alteraciones se localizan principalmente en el dominio histona acetiltransferasa (HAT) o próximas a él, o de *TNFRSF14*, molécula de superficie que modula la respuesta inmune y cuyas alteraciones afectan principalmente al dominio extracelular, fundamentalmente en los exones 3 y 4, siendo en su mayoría alteraciones que truncan la proteína. Las mutaciones en el gen *EZH2*, que codifica la subunidad catalítica del complejo PRC2 (*polycomb repressor complex 2*), tuvieron lugar en el residuo Y646 que comprende el *hotspot* de la proteína localizado en el dominio metiltransferasa C-terminal o dominio *SET*. Algo parecido ocurre en el caso del gen *STAT6*, ya que las mutaciones se agruparon principalmente en el residuo D419 que forma parte del dominio de unión al ADN del factor de transcripción que codifica. Además, tanto en *EZH2* como en *STAT6*, las mutaciones fueron puntuales de tipo *missense* en todos los casos. En el caso de *FOXO1*, gen que codifica un factor de transcripción, las mutaciones fueron principalmente *missense* y se localizaron en el exón 1. Las alteraciones en la histona acetiltransferasa codificada por el gen *EP300* fueron mutaciones de tipo *missense* localizadas en su dominio HAT y, en el caso del gen *CARD11*, se observaron deleciones *inframe* y mutaciones *missense* localizadas principalmente en el dominio *coiled-coil* de la proteína *scaffold* que codifica, cuyo papel en la activación constitutiva de la vía NF- κ B ha sido demostrada en estudios previos con líneas celulares de linfoma.³⁵ En el resto (*KMT2D*, *BCL2*, *ARID1A*, *GNA13*, *IRF8*, *SMARCA4* y *HIST1H1E*), las alteraciones se observaron distribuidas a lo largo del todo el gen. Varios de los casos analizados presentaron más de una mutación en los genes *KMT2D* (n=26) y *BCL2* (n=17), identificando en cada gen un total de 77 mutaciones en 46 y 34 pacientes con LF, respectivamente.

En cuanto al gen *BCL2*, se definió como hipermutación cualquier variante presente con una VAF del 10% o superior²⁴ de forma que, de los 34 pacientes (41%) que presentaron variantes somáticas en este gen, en 30 pacientes (88%) se observó hipermutación de *BCL2*. Además, como era de esperar, ningún paciente con LF negativo para la t(14;18) (n=14) mostró mutaciones en el gen *BCL2* (0% vs. 49.3%, $P < 0.01$), y por tanto tampoco hipermutación (0% vs. 43.5%, $P < 0.01$). De forma similar, los casos con mutaciones en el gen *MEF2B* (n=7) se observaron exclusivamente en el grupo de pacientes con t(14;18) positiva. Las diferencias no fueron estadísticamente significativas en este caso.

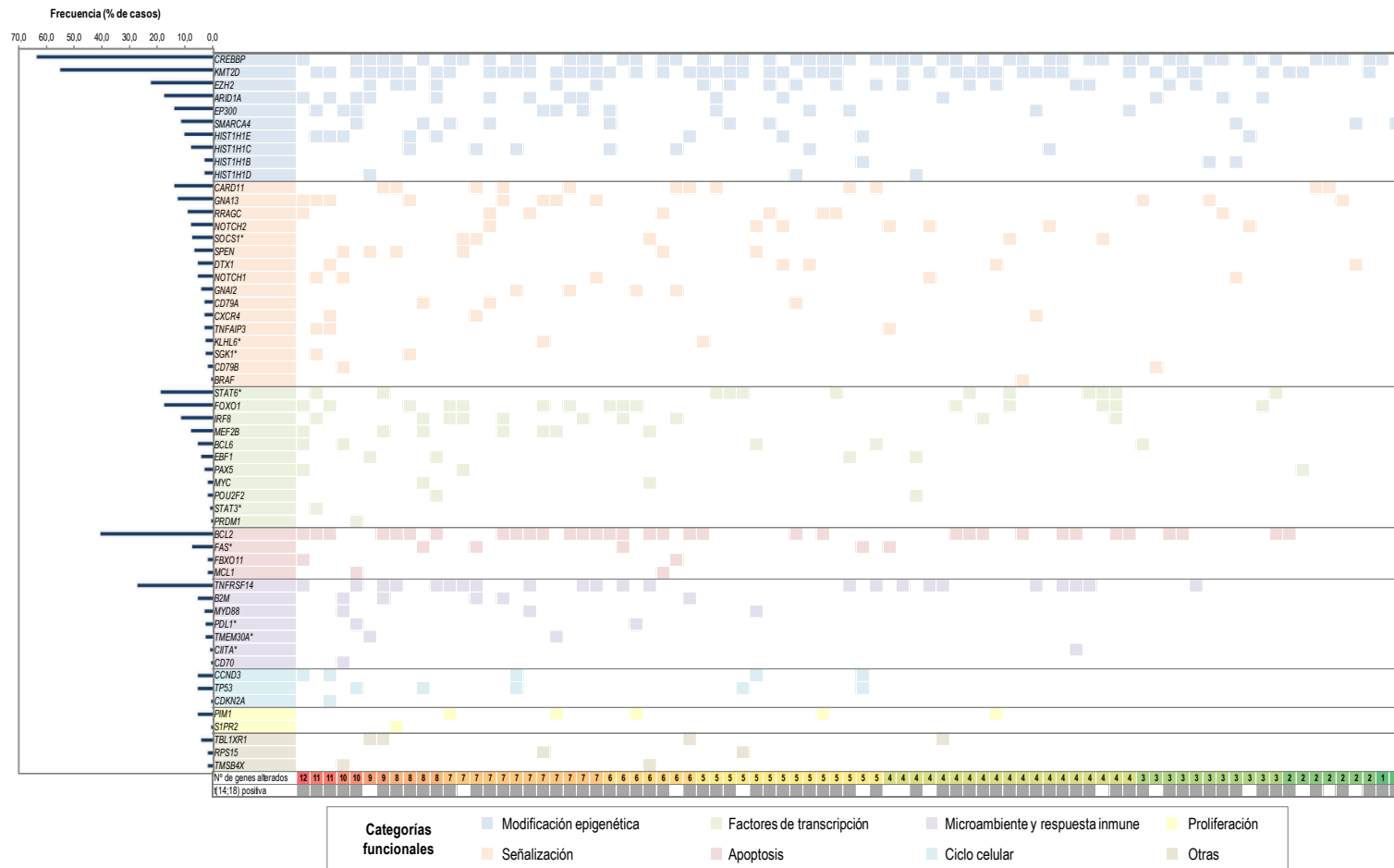


Figura 2. Distribución de los genes recurrentemente mutados en la serie de linfoma folicular (LF) analizada (n=83). Cada columna representa un caso y cada fila representa un gen. Los cuadros coloreados indican la presencia de alteraciones en el gen y caso correspondientes. Todos los genes se agrupan en función de la categoría funcional a la que corresponden. A la izquierda de la imagen se representa el porcentaje de casos con alteraciones en cada uno de los genes analizados mediante un diagrama de barras. En la parte inferior de la misma se puede observar el número de genes alterados en cada caso mediante un gradiente de colores desde el color rojo, casos con mayor número de genes alterados, hasta el color verde, aquellos con un número menor de genes alterados, además de los casos positivos para la t(14;18). *Genes estudiados sólo en los 62 casos secuenciados mediante tecnología de captura.

4. Categorías funcionales afectadas en el LF

Los 56 genes que presentaron alteraciones en los pacientes con LF fueron agrupados en 8 categorías funcionales en base a la función biológica de la proteína que codifican (Tabla 2). La categoría funcional más frecuentemente alterada en los pacientes estudiados fue *modificación epigenética*, alterada en 80 casos (96.4%) con un total de 223 mutaciones, seguida de la categoría de *señalización* (66.3%, n=55), con un total de 95 mutaciones, y la más grande ya que incluye un total de 16 genes. Dentro de esta categoría funcional se encuentran 6 genes que forman parte de la vía de señalización *CXCR4/BCR* (Tabla 3) y, por tanto, implicados en la activación o inhibición de NF- κ B, alterada en 23 casos del total de pacientes (27.7%), siendo el gen *CARD11* (14.5%) el más recurrentemente alterado de la vía *CXCR4/BCR*. Por otro lado, esta categoría incluye 4 genes implicados en la vía de NOTCH y su regulación (Tabla 3), descrita como recurrentemente mutada en trabajos previos de LF.^{17,36} En la presente serie, esta vía de señalización está alterada en un total de 15 pacientes con LF (18.1%), siendo *NOTCH2* el gen más frecuentemente mutado (8.4%).

Tabla 2. Categorías funcionales en las que se agrupan los 56 genes con alteraciones en la serie de pacientes con linfoma folicular (LF, n=83), en base a la función biológica de la proteína que codifican.

Categoría funcional	Modificación epigenética	Señalización	Factores de transcripción	Apoptosis
Genes incluidos	<i>ARID1A</i> <i>CREBBP</i> <i>EP300</i> <i>EZH2</i> <i>HIST1H1B</i> <i>HIST1H1C</i> <i>HIST1H1D</i> <i>HIST1H1E</i> <i>KMT2D</i> <i>SMARCA4</i>	<i>BRAF</i> <i>CARD11^B</i> <i>CD79A^B</i> <i>CD79B^B</i> <i>CXCR4^B</i> <i>DTX1^N</i> <i>GNA13</i> <i>GNAI2</i> <i>KLHL6^B</i> <i>NOTCH1^N</i> <i>NOTCH2^N</i> <i>RRACG</i> <i>SGK1</i> <i>SOCS1</i> <i>TNFAIP3^B</i> <i>SPEN^N</i>	<i>BCL6</i> <i>EBF1</i> <i>FOXO1</i> <i>IRF8</i> <i>MEF2B</i> <i>MYC</i> <i>PAX5</i> <i>POU2F2</i> <i>PRDM1</i> <i>STAT3</i> <i>STAT6</i>	<i>BCL2</i> <i>FAS</i> <i>FBXO11</i> <i>MCL1</i>
Nº pacientes (%)	80 (96.4)	55 (66.3)	41 (49.4)	40 (48.2)
Nº de mutaciones (media, rango)	223 (22.3, 3-77)	95 (5.9, 1-15)	71 (11.8, 1-21)	87 (21.7, 2-77)
VAF media (%)	32%	27%	25.8%	21.9%
Categoría funcional	Microambiente y respuesta inmune	Ciclo celular	Proliferación	Otras
Genes incluidos	<i>B2M</i> <i>CD70</i> <i>CIITA</i> <i>MYD88</i> <i>PDL1</i> <i>TMEM30A</i> <i>TNFRSF14</i>	<i>CCND3</i> <i>CDKN2A</i> <i>TP53</i>	<i>PIM1</i> <i>S1PR2</i>	<i>RPS15</i> <i>TBL1XR1</i> <i>TMSB4X</i>
Nº pacientes (%)	30 (36.1)	8 (9.6)	6 (7.2)	8 (9.6)
Nº de mutaciones (media, rango)	44 (11, 1-26)	12 (4, 1-6)	8 (4, 1-7)	8 (4, 2-8)
VAF media (%)	30.6%	34.8%	29.6%	23.8%

^BGenes involucrados en la vía *CXCR4/BCR*. ^NGenes involucrados en la vía de NOTCH. VAF, frecuencia de la variante alterada.

Las categorías *factores de transcripción* (49.4%, n=41) con 71 mutaciones, *apoptosis* (48.2%, n=40) con 87 mutaciones, y *microambiente y respuesta inmune* (36.1%, n=30) con 44 mutaciones fueron detectadas en frecuencias menores, pero superiores respecto a las categorías de *ciclo celular* (9.6%, n=8) y *proliferación* (7.2%,

n=6), con 12 y 8 mutaciones, respectivamente. Por último, aquellos genes clasificados como *otras categorías* presentaron alteraciones en 8 casos (9.6%), englobando un gen codificante de proteínas ribosomales (*RPS15*), un gen involucrado en transcripción (*TBL1RX1*) y uno implicado en la organización del citoesqueleto (*TMSB4X*), con un total de 8 mutaciones en el conjunto de todos ellos.

Todos los casos presentaron al menos una categoría funcional alterada (media, 3.2; intervalo, 1-6), siendo 3 los casos que presentaron alteraciones sólo en *modificación epigenética*. El resto de pacientes presentaron alteraciones en dos o más categorías funcionales. Todas las categorías funcionales mostraron una VAF media homogénea, sin diferencias significativas entre ninguna de ellas, indicando que las alteraciones observadas se encontraron en el clon dominante del LF en la serie de pacientes analizada.

5. Número de mutaciones y genes mutados en el LF

En la serie de pacientes con LF analizada, se observó una media de 5.1 ± 2.3 genes alterados por pacientes (intervalo, 1-12), y una media de 6.6 ± 3.6 mutaciones (intervalo, 1-18). En base al número medio de genes alterados, se dividió la serie de 83 pacientes con LF en dos grupos, por un lado aquellos con menos de 6 genes alterados por paciente (1-5 genes, n=53) y por otro, aquellos que presentaron 6 o más de 6 genes alterados por paciente (6-12 genes, n=30).

No se observaron diferencias significativas en las características clínicas de los pacientes en función del número de genes alterados, ya que presentaron la misma distribución en cuanto a grado histológico, FLIPI al diagnóstico y requerimiento de tratamiento, entre otras (Tabla suplementaria S2). Sin embargo, cabe destacar la diferente distribución de algunos de los genes analizados en función del grupo, como se puede observar en la Figura 3. En ella se puede ver que los genes *BCL2* (28% vs. 63%, $P < 0.01$), *TNFRSF14* (19% vs. 43%, $P < 0.05$), *ARID1A* (11% vs. 30%, $P < 0.05$), *FOXO1* (9% vs. 33%, $P < 0.05$), *GNA13* (6% vs. 27%, $P < 0.05$), *IRF8* (4% vs. 27%, $P < 0.01$) y *MEF2B* (0% vs. 23%, $P < 0.01$) aparecen alterados con una frecuencia significativamente mayor en el grupo de pacientes con 6 o más genes alterados. De la misma forma, se observó un sesgo en cuanto a las categorías funcionales, ya que las categorías de *señalización* (45% vs. 77%, $P < 0.01$), *apoptosis* (32% vs. 77%, $P < 0.01$), *factores de transcripción* (36% vs. 73%, $P < 0.01$), *microambiente* (21% vs. 63%, $P < 0.01$) y *otras categorías* (6% vs. 30%, $P < 0.01$) aparecieron alteradas con frecuencia significativamente mayor en el grupo de pacientes con 6 o más genes alterados (Figura 3).

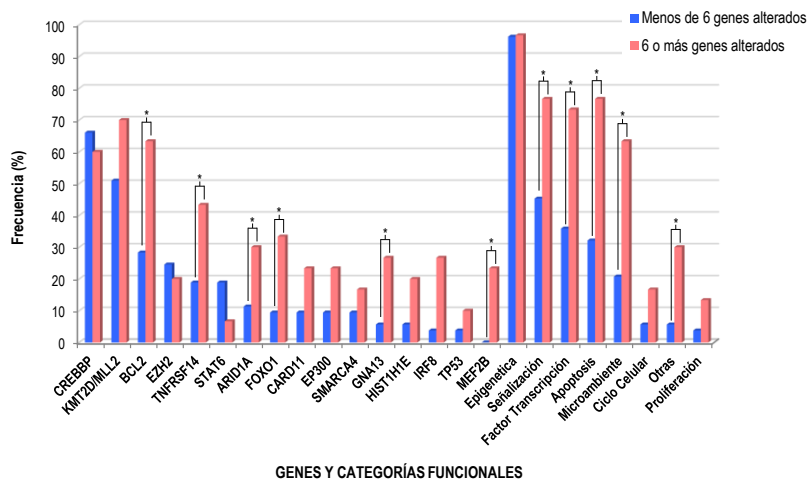


Figura 3. Distribución de los genes y las categorías funcionales en que se agrupan, en función de que los pacientes presenten menos de 6 ó 6 o más genes alterados. Los genes alterados en frecuencias superiores al 10% en la serie de pacientes con linfoma folicular (LF) analizada (n=83), *TP53* y *MEF2B* por su interés particular, y las distintas categorías funcionales se representan a lo largo del eje X del gráfico de barras. * $P < 0.05$

6. Aplicación del modelo pronóstico m7-FLIPI

Todos los genes incluidos en el modelo pronóstico de riesgo clínico-genético m7-FLIPI, descrito por Pastore A *et al.* en 2015, fueron incluidos en ambos diseños de secuenciación masiva y analizados en la presente serie de 83 pacientes con LF.²⁴ Seis de los 7 genes que incluye este modelo (*EP300* 14.5% [12], *FOXO1* 18.1% [15], *CREBBP* 63.9% [n=53], *CARD11* 14.5% [12], *ARID1A* 18.1% [15] y *EZH2* 22.9% [19]) fueron identificados en frecuencias superiores al 10% en la presente serie. En el caso de *MEF2B*, el gen restante, la frecuencia en la serie analizada fue inferior al 10% ya que sólo se observó alterado en 7 casos (8.4%), similar a lo descrito en el artículo de Pastore *et al* (9.9%).

El score m7-FLIPI se pudo calcular en 74 pacientes (89%), observando que 17 pacientes (23%) con LF clasificados en el grupo con FLIPI de alto riesgo fueron reclasificados en el grupo de bajo riesgo según el modelo m7-FLIPI (Figura 4). Estos casos reclasificados presentaron una frecuencia de alteración mayor de los genes *EZH2* (47% vs. 0%), *MEF2B* (17.6% vs. 5.9%) y *ARID1A* (29.4% vs. 5.9%), clasificados como genes de bajo riesgo y con puntuación positiva en el m7-FLIPI, respecto a los 17 casos mantenidos en el grupo de alto riesgo. En los 9 casos restantes, el m7-FLIPI no fue calculado ya que no se pudo obtener el dato de FLIPI y/o ECOG en el momento del diagnóstico.

La SLFT a 5 años en el grupo de pacientes que recibió rituximab en combinación con quimioterapia (R-IQT, n=47) no fue diferente para los casos clasificados como alto o bajo riesgo según el modelo m7-FLIPI (36% vs. 74%, $P > 0.1$) (Figura Suplementaria S2). De la misma forma, el modelo m7-FLIPI no pareció ser útil para predecir de supervivencia global (SG) a 10 años en este grupo de pacientes, ya que no hubo diferencias entre

los grupos alto y bajo riesgo (67% vs. 64%, $P > 0.1$) (Figura Suplementaria S2). Por el contrario, el índice FLIPI sí que distinguió dos subgrupos con diferente SG (88% vs. 45%, $P < 0.05$) dentro del grupo de pacientes tratado homogéneamente (Figura Suplementaria S2).

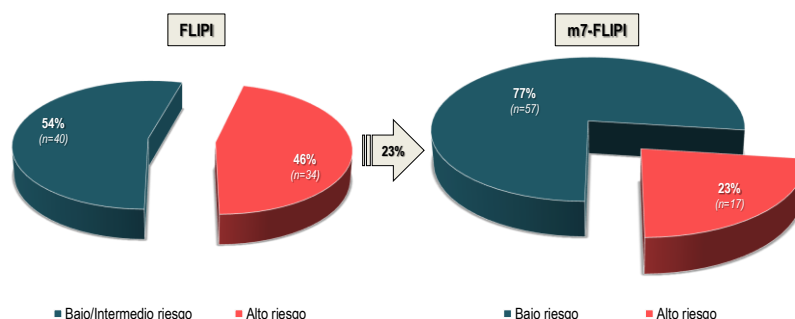


Figura 4. Diagramas circulares que representan la reclasificación según el modelo de riesgo clinicogenético m7-FLIPI de los pacientes con LF incluidos en el presente estudio. El modelo m7-FLIPI reclasificó 17 pacientes en el grupo de bajo riesgo, clasificados como alto riesgo según el índice pronóstico internacional del LF (FLIPI).

7. Impacto del perfil mutacional en la evolución clínica de la serie

Debido a la heterogeneidad de tratamiento en los 69 pacientes con LF tratados con intención curativa como consecuencia del carácter retrospectivo del estudio, los análisis de supervivencia se llevaron a cabo en el grupo de pacientes tratados con R-IQT ($n=47$). En este grupo de pacientes, 22 casos (48%) alcanzaron RC tras el tratamiento de inducción y 23 pacientes (62%) se encontraban en RC tras 30 meses desde el inicio del tratamiento (CR30), siendo su SLFT a 5 y 10 años del 64% y 38%, respectivamente.

Sobre este grupo de pacientes se testó el modelo de riesgo clínico-genético m7-FLIPI²⁴ en una serie no seleccionada, y se estudió el impacto del número de genes alterados en la evolución clínica (SLFT, CR30, SG y TH), los genes alterados con recurrencia superior al 10% y las categorías funcionales en que se agrupan los genes incluidos en el estudio.

Todas las variables fueron testadas en la fecha del diagnóstico, y ninguna se asoció con características clínicas de riesgo en la serie de LF como FLIPI alto, grado histológico 2-3A, estadio Ann Arbor IV o necesidad de tratamiento. Sin embargo, se observó una asociación estadísticamente significativa entre las alteraciones en el gen *CREBBP* y una edad menor de 60 años en el momento del diagnóstico ($P < 0.05$).

Para determinar si una mayor complejidad génica tenía impacto en la evolución clínica de los pacientes, se evaluó el número de genes alterados con SLFT observando una menor SLFT según aumenta el número de genes alterados (Figura Suplementaria S3), pudiendo identificar dos grupos con distinto riesgo de fracaso terapéutico, coincidiendo con el número medio de genes alterados. Por tanto, la presencia de 6 o más genes alterados se asoció con mayor riesgo de fracaso terapéutico y, por tanto, menor SLFT a 5 años (30% vs. 82%, P

< 0.001) (Figura 5A). Además, esta variable es capaz de distinguir un subgrupo con mayor riesgo de fracaso terapéutico a 5 años dentro del grupo de bajo riesgo según el índice FLIPI (43% vs. 92%, $P < 0.05$) y el modelo m7-FLIPI (43% vs. 90%, $P < 0.01$) (Figura Suplementaria S4). Dentro de este contexto, los pacientes con alteraciones en el gen *FOXO1* (25% vs. 68%, $P < 0.05$) (Figura 5B) y/o aquellos con alteraciones en genes incluidos en la categoría funcional *apoptosis* (52% vs. 74%, $P = 0.01$) (Figura 5C), mostraron significativamente menor SLFT a 5 años que el resto de pacientes. Esta categoría incluye al gen *BCL2* (41%) recurrentemente alterado en LF pero sin implicación pronóstica, además de *FAS* (8%), *FBXO11* (2%) y *MCL1* (2%), que debido al bajo número de casos no mostraron asociación significativa con SLFT individualmente.

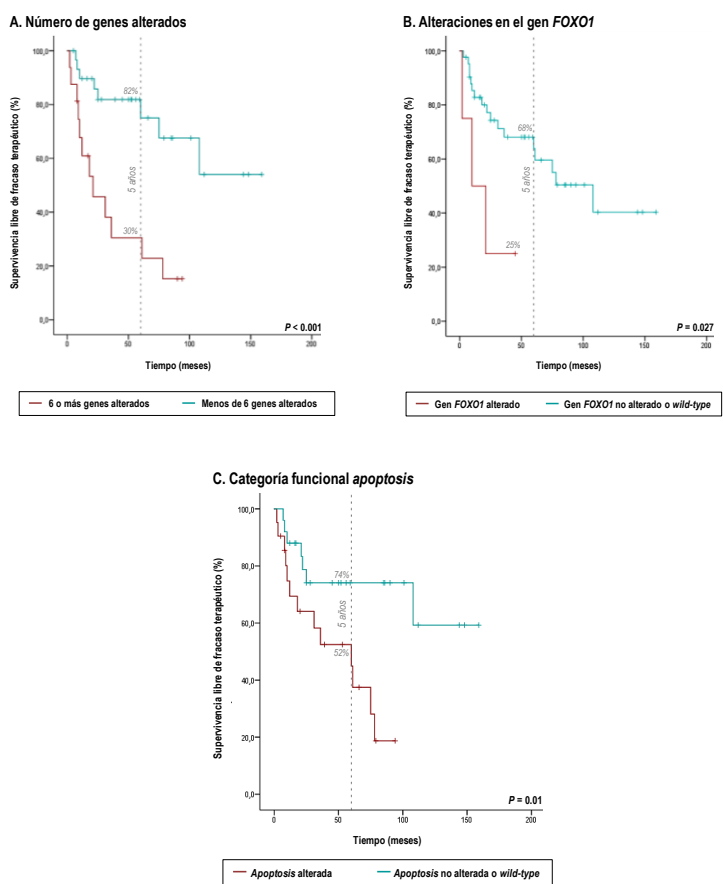


Figura 5. Análisis Kaplan-Meier de la supervivencia libre de fracaso terapéutico (SLFT) a 5 años en los pacientes con linfoma folicular tratados con R-IQT (LF, n=47) en función (A) del número de genes alterados en el momento del diagnóstico, (B) la presencia o ausencia de alteraciones en el gen *FOXO1*, y (C) la presencia o ausencia de alteraciones en la categoría funcional *apoptosis*. Los pacientes con alteraciones en (A) 6 o más genes, (B) el gen *FOXO1*, o (C) *apoptosis*, se representan con una línea granate, mientras que aquellos (A) con alteraciones en menos de 6 genes, (B) *FOXO1* no alterado o *wild-type*, o (C) sin alteraciones en la categoría *apoptosis*, son representados con una línea azul. La línea vertical discontinua indica 5 años de seguimiento.

Respecto al CR30, aquellos pacientes que presentaron alteraciones en 6 o más genes (28.6% vs. 82.6%, $P < 0.01$) mostraron una asociación significativa con menor tasa de RC a los 30 meses. Por el contrario, las alteraciones en el gen *EZH2* se asociaron a mayor incidencia de casos en CR30 (100% vs. 53.3%, $P < 0.05$).

En cuanto a supervivencia global (SG), los pacientes con alteraciones en 6 o más genes presentaron una menor SG a 10 años que el resto de pacientes de forma significativa (49% vs. 76%, $P < 0.05$) (Figura 6), incluso dentro del grupo de pacientes con FLIPI de bajo riesgo (47% vs. 79%, $P < 0.05$) (Figura Suplementaria S5).

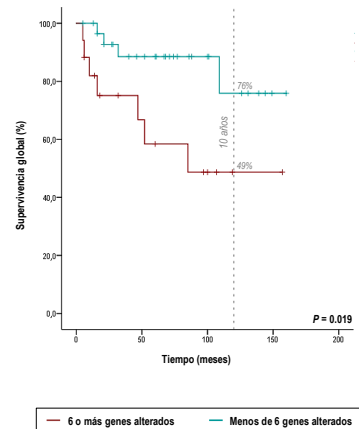


Figura 5. Análisis Kaplan-Meier de la supervivencia global (SG) a 10 años en los pacientes con linfoma folicular tratados con R-IQT (LF, n=47) en función del número de genes alterados en el momento del diagnóstico. Los pacientes con alteraciones en 6 o más genes se representan con una línea granate, mientras que aquellos con alteraciones en menos de 6 genes son representados con una línea azul. La línea vertical discontinua indica 10 años de seguimiento.

Los cinco pacientes que presentaron mutaciones en el gen *TP53* en el momento del diagnóstico, mostraron FLIPI alto. Tres de estos cinco pacientes recibieron R-IQT y dos de ellos no alcanzaron CR30, presentando fracaso terapéutico antes de alcanzar los 5 años de seguimiento. Por tanto, estos casos mostraron una SLFT a 5 años significativamente inferior que la de los casos sin mutaciones en *TP53* (33% vs. 67%, $P < 0.01$), y los dos fallecieron por progresión de su enfermedad a los 5 y 10 meses del diagnóstico.

Ni el FLIPI, ni el m7-FLIPI, fueron índices predictores de TH a linfoma agresivo en la presente serie de LF. Además, ninguna de las variables biológicas analizadas se asoció a mayor riesgo de TH a 10 años.

En el análisis multivariante, se incluyeron como covariables el índice FLIPI y m7-FLIPI junto con las variables biológicas con asociación significativa en el análisis univariante, con excepción de *TP53* debido al bajo número de casos con mutaciones en este gen. Las variables asociadas independientemente con mayor riesgo de fracaso terapéutico a 5 años y, por tanto, menor SLFT fueron presentar alteraciones en 6 o más genes (HR: 3.5, IC 95%: 1.1-11.1) y presentar mutaciones en el gen *FOXO1* (HR: 0.2, IC 95%: 0.1-0.9) (Tabla 3). En términos de SG, el número de genes mutados mantuvo su significación estadística (HR: 5.4, IC 95%: 1.5-19.6), mostrándose como una variable asociada independientemente con supervivencia global junto con el índice pronóstico FLIPI (HR: 7.2, IC 95%: 1.3-39.1) (Tabla 3).

Tabla 3. Resultados del análisis univariante y multivariante de los factores implicados en la supervivencia libre de fracaso terapéutico (SLFT) a 5 años y supervivencia global (SG) a 10 años.

Variable	SLFT (%) a 5 años	U (P-valor)	M (P-valor)	HR [IC 95%]
FLIPI				
Bajo/Intermedio (referencia)	74.1%	0.119	-	-
Alto	55.5%		0.198	2.1 [0.7-6.8]
m7-FLIPI				
Bajo (referencia)	73.9%	0.112	-	-
Alto	36.5%		0.450	1.6 [0.5-5.0]
Seis o más genes alterados (si)	30.5%	4.1x10 ⁻⁴	0.037	3.5 [1.1-11.1]
FOXO1 alterado (si)	25.0%	0.027	0.039	0.2 [0.1-0.9]
Categoría apoptosis alterada (si)	52.4%	0.010	0.198	2.3 [0.6-7.8]
Variable	SG (%) a 10 años	U (P-valor)	M (P-valor)	HR [IC 95%]
FLIPI				
Bajo/Intermedio (referencia)	88.2%	0.021	-	-
Alto	45.2%		0.021	7.1 [1.3-39.1]
m7-FLIPI				
Bajo (referencia)	67.0%	0.242	-	-
Alto	64.3%		0.798	0.8 [0.2-3.2]
Seis o más genes alterados (si)	48.7%	0.019	0.011	5.4 [1.5-19.6]

FLIPI, índice pronóstico internacional para el linfoma folicular (LF); HR, hazard ratio; IC, intervalo de confianza; M, análisis multivariante; SG, supervivencia global; SLFT, supervivencia libre de fracaso terapéutico; U, análisis univariante.

DISCUSIÓN

La necesidad de estratificar a los pacientes con LF según su riesgo, lleva a la búsqueda constante de factores clínicos y biológicos, y al desarrollo de índices o modelos de riesgo que permitan una toma de decisiones terapéuticas más precisa acerca del tratamiento en primera línea o la inclusión de estos pacientes en ensayos clínicos. Con este objetivo, fue desarrollado el modelo de riesgo clínico-genético m7-FLIPI que, sin embargo, no parece ser suficientemente preciso en la identificación de pacientes de alto riesgo en poblaciones no seleccionadas.¹⁷

Por otro lado, la incorporación de las técnicas de secuenciación masiva ha hecho posible una mejora en el conocimiento de la patogénesis del LF, así como la identificación de nuevos genes recurrentemente mutados que participan en la biología de la enfermedad. A pesar de ello, el impacto de la mayoría de las alteraciones genéticas en la evolución clínica de pacientes con LF no es bien conocido. Por ello, en el presente trabajo se planteó analizar en profundidad el perfil mutacional y su impacto en la evolución clínica en una serie de 83 pacientes con LF, en términos de SLFT, CR30, SG y riesgo de TH, mostrando por primera vez el impacto clínico que presenta la complejidad genética en el LF considerando el número de genes alterados.

El perfil mutacional de la serie de pacientes analizada identificó 14 genes recurrentes en el LF que, en concordancia con resultados previos, ya habían sido descritos en su mayoría como eventos *driver* y/o tempranos en la patogénesis del LF.^{9;12;17;22;33;37;38} En concordancia con la literatura, el 83% de los pacientes analizados presentaron la t(14;18), y el 43% de este grupo mostró hipermutación en el gen *BCL2*. No se observó ningún paciente negativo para la t(14;18) con mutaciones en el gen *BCL2*, ni tampoco en *MEF2B*, de acuerdo con resultados previos.³⁹ Además, el 96% de los casos con LF presentó alteraciones en reguladores epigenéticos, un evento característico del LF junto con la t(14;18).^{9;22;37;38} Los resultados en esta serie confirmaron que, además de los genes implicados en modificación epigenética, aquellos implicados en señalización y factores de transcripción están comúnmente alterados en el LF, presentando un papel importante en el mantenimiento del programa genético de la célula B centro germinal (CG).^{14;17;19;24;38;40} Las lesiones genéticas en estos genes podrían por tanto ser responsables del bloqueo en la diferenciación de las células B CG dando lugar a su transformación maligna y expansión clonal, sin completar su diferenciación a células plasmáticas o de memoria.^{32;38;41} Además, las alteraciones en los genes responsables de la modificación epigenética, y en concreto *CREBBP*, se asocian con expresión antigénica disminuida que proporciona a la célula tumoral un mecanismo de evasión inmune en el LF.^{42;43} Por otro lado, este gen se asoció con diagnóstico temprano (edad al diagnóstico <60 años), confirmando su importancia en el proceso de linfomagénesis y su asociación con evolución precoz del LF.^{37;44}

Se evaluó el papel del modelo de riesgo clínico-genético m7-FLIPI, considerando que se está ante una serie no seleccionada de pacientes que representa la práctica clínica de un hospital, donde todos los casos fueron tratados con rituximab asociado a esquemas de quimioterapia (n=47).²⁴ El modelo m7-FLIPI permitió reclasificar el 50% de los pacientes con FLIPI alto en el grupo de bajo riesgo, tal y como sucede en la serie original, sin embargo y a diferencia de ésta, no se observaron diferencias significativas en SLFT y SG entre los grupos de riesgo establecidos por este modelo. Por tanto, a pesar de que la cohorte de pacientes presentó características clínicas y esquemas de tratamiento similares a los de la cohorte original, el m7-FLIPI no pareció ser útil para predecir SLFT o SG en la presente serie, tal y como ocurre en otro estudio reciente.¹⁷ Si bien, teniendo en cuenta el relativamente reducido número de pacientes evaluados en ambos estudios en comparación con la serie original, el m7-FLIPI parece mostrar una aplicabilidad limitada en poblaciones diferentes de pacientes. Algunos de los genes que integran el modelo de riesgo mostraron, en la serie analizada, una correlación con mejor (*EZH2*) o peor (*FOXO1*) evolución clínica, de modo análogo al trabajo original. Sin embargo, otros genes relevantes en este modelo como *ARID1A* y *EP300* no se asociaron a diferente pronóstico, pudiendo explicar las diferencias entre estudios. Estos resultados discordantes se observaron también en el estudio realizado en la serie del ensayo clínico PRIMA, donde *ARID1A* no se asoció a pronóstico e, incluso, *FOXO1* se correlacionó con mejor pronóstico.⁴⁵ En conjunto, *EZH2* es el único gen consistente entre distintos estudios mostrando un impacto pronóstico favorable.^{18,46-49}

El hallazgo más relevante del estudio fue la correlación de una mayor complejidad génica, definida como presencia de alteraciones en 6 o más genes, con un peor pronóstico, independientemente del índice pronóstico FLIPI. Estos resultados son concordantes con los datos recientemente publicados en relación a que una mayor complejidad en cuanto a alteraciones cromosómicas se asocia a un peor pronóstico en LF,⁵⁰ y similar a lo obtenidos en otras neoplasias hematológicas.^{51,52} Cabe destacar que genes como *ARID1A* o *MEF2B*, asociados a buen pronóstico en el estudio del m7-FLIPI, se asocian al grupo de mayor complejidad génica en el presente estudio y, por tanto, de peor pronóstico. El estudio combinado de mutaciones genéticas y alteraciones cromosómicas podría explicar las discordancias observadas en el pronóstico respecto a determinados genes, permitiendo determinar con mayor profundidad el impacto pronóstico de la complejidad en el LF. Como limitación del presente estudio se debe considerar el número de pacientes y que el empleo de paneles de regiones seleccionados podría conllevar una pérdida de información en genes con potencial relevancia clínica.

En la presente serie de LF, 15 pacientes (18%) experimentaron TH a linfoma agresivo (LFT), siendo en todos los casos LDCBG. Ninguna de las variables clínico-biológicas analizadas en el momento del diagnóstico de LF mostró asociación con riesgo de transformación histológica a 10 años. No obstante, el bajo número de

casos analizado no permite obtener conclusiones definitivas tanto en el impacto del perfil mutacional como de la complejidad génica en riesgo de TH.

En resumen, el presente trabajo amplía los conocimientos en la biología del LF mediante el estudio del perfil mutacional, confirmando la dependencia de la célula tumoral de las alteraciones en reguladores epigenéticos, señalización y factores de transcripción involucrados principalmente en el programa genético de la célula B CG, mostrando por primera vez el impacto clínico en el LF de la complejidad genética en cuanto al número de genes alterados. El hallazgo más relevante del estudio fue la asociación entre una mayor complejidad génica y una menor tasa de CR30, peor SLFT y corta SG en una serie de pacientes tratados homogéneamente, independientemente del índice pronóstico FLIPI. La confirmación de estos resultados en una cohorte mayor e independiente de pacientes, permitiría desarrollar nuevos modelos predictores de riesgo con el objetivo de mejorar la estratificación de los pacientes con LF y desarrollar estrategias terapéuticas adaptadas al riesgo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Salles G, Seymour JF, Offner F et al. Rituximab maintenance for 2 years in patients with high tumour burden follicular lymphoma responding to rituximab plus chemotherapy (PRIMA): a phase 3, randomised controlled trial. *Lancet* 2011;377:42-51.
2. Flinn IW, van der JR, Kahl BS et al. Randomized trial of bendamustine-rituximab or R-CHOP/R-CVP in first-line treatment of indolent NHL or MCL: the BRIGHT study. *Blood* 2014;123:2944-2952.
3. Casulo C, Byrtek M, Dawson KL et al. Early Relapse of Follicular Lymphoma After Rituximab Plus Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine, and Prednisone Defines Patients at High Risk for Death: An Analysis From the National LymphoCare Study. *J.Clin.Oncol.* 2015;33:2516-2522.
4. Jurinovic V, Kridel R, Staiger AM et al. Clinicogenetic risk models predict early progression of follicular lymphoma after first-line immunochemotherapy. *Blood* 2016;128:1112-1120.
5. Fischer T, Zing NPC, Chiattoni CS, Federico M, Luminari S. Transformed follicular lymphoma. *Ann.Hematol.* 2018;97:17-29.
6. Montoto S, Davies AJ, Matthews J et al. Risk and clinical implications of transformation of follicular lymphoma to diffuse large B-cell lymphoma. *J.Clin.Oncol.* 2007;25:2426-2433.
7. Casulo C, Burack WR, Friedberg JW. Transformed follicular non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 2015;125:40-47.
8. Alcoceba, M., Alonso-Alvarez, S., García-Álvarez, M, Martín, A, and Caballero, M. D. Unmet needs in histological transformation of follicular lymphoma: a clinical and biological review. *Ann.Lymphoma* 1. 21-11-2017.
9. Tsujimoto Y, Cossman J, Jaffe E, Croce CM. Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* 1985;228:1440-1443.
10. Weiss LM, Warnke RA, Sklar J, Cleary ML. Molecular analysis of the t(14;18) chromosomal translocation in malignant lymphomas. *N.Engl.J.Med.* 1987;317:1185-1189.
11. Basso K, la-Favera R. Germinal centres and B cell lymphomagenesis. *Nat.Rev.Immunol.* 2015;15:172-184.
12. Green MR, Gentles AJ, Nair RV et al. Hierarchy in somatic mutations arising during genomic evolution and progression of follicular lymphoma. *Blood* 2013;121:1604-1611.
13. Li H, Kaminski MS, Li Y et al. Mutations in linker histone genes HIST1H1 B, C, D, and E; OCT2 (POU2F2); IRF8; and ARID1A underlying the pathogenesis of follicular lymphoma. *Blood* 2014;123:1487-1498.
14. Pasqualucci L, Khiabani H, Fangazio M et al. Genetics of follicular lymphoma transformation. *Cell Rep.* 2014;6:130-140.
15. Okosun J, Bodor C, Wang J et al. Integrated genomic analysis identifies recurrent mutations and evolution patterns driving the initiation and progression of follicular lymphoma. *Nat.Genet.* 2014;46:176-181.
16. Bouska A, Zhang W, Gong Q et al. Combined copy number and mutation analysis identifies oncogenic pathways associated with transformation of follicular lymphoma. *Leukemia* 2017;31:83-91.
17. Krysiak K, Gomez F, White BS et al. Recurrent somatic mutations affecting B-cell receptor signaling pathway genes in follicular lymphoma. *Blood* 2017;129:473-483.
18. Morin RD, Johnson NA, Severson TM et al. Somatic mutations altering EZH2 (Tyr641) in follicular and diffuse large B-cell lymphomas of germinal-center origin. *Nat.Genet.* 2010;42:181-185.
19. Morin RD, Mendez-Lago M, Mungall AJ et al. Frequent mutation of histone-modifying genes in non-Hodgkin lymphoma. *Nature* 2011;476:298-303.

20. Pasqualucci L, Dominguez-Sola D, Chiarenza A et al. Inactivating mutations of acetyltransferase genes in B-cell lymphoma. *Nature* 2011;471:189-195.
21. Zhang J, Dominguez-Sola D, Hussein S et al. Disruption of KMT2D perturbs germinal center B cell development and promotes lymphomagenesis. *Nat.Med.* 2015;21:1190-1198.
22. Korfi K, Ali S, Heward JA, Fitzgibbon J. Follicular lymphoma, a B cell malignancy addicted to epigenetic mutations. *Epigenetics.* 2017;12:370-377.
23. Solal-Celigny P, Roy P, Colombat P et al. Follicular lymphoma international prognostic index. *Blood* 2004;104:1258-1265.
24. Pastore A, Jurinovic V, Kridel R et al. Integration of gene mutations in risk prognostication for patients receiving first-line immunochemotherapy for follicular lymphoma: a retrospective analysis of a prospective clinical trial and validation in a population-based registry. *Lancet Oncol.* 2015;16:1111-1122.
25. Federico M, Bellei M, Marcheselli L et al. Follicular lymphoma international prognostic index 2: a new prognostic index for follicular lymphoma developed by the international follicular lymphoma prognostic factor project. *J.Clin.Oncol.* 2009;27:4555-4562.
26. Bachy E, Maurer MJ, Habermann TM et al. A simplified scoring system in de novo follicular lymphoma treated initially with immunochemotherapy. *Blood* 2018;132:49-58.
27. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Revised 4th Edition.: IARC Press; 2017.
28. Lynch RC, Gratzinger D, Advani RH. Clinical Impact of the 2016 Update to the WHO Lymphoma Classification. *Curr.Treat.Options.Oncol.* 2017;18:45.
29. Kridel R, Sehn LH, Gascoyne RD. Pathogenesis of follicular lymphoma. *J.Clin.Invest* 2012;122:3424-3431.
30. Mamessier E, Song JY, Eberle FC et al. Early lesions of follicular lymphoma: a genetic perspective. *Haematologica* 2014;99:481-488.
31. Lackraj T, Goswami R, Kridel R. Pathogenesis of follicular lymphoma. *Best.Pract.Res.Clin.Haematol.* 2018;31:2-14.
32. Lunning MA, Green MR. Mutation of chromatin modifiers; an emerging hallmark of germinal center B-cell lymphomas. *Blood Cancer J.* 2015;5:e361.
33. Kishimoto W, Nishikori M. Molecular pathogenesis of follicular lymphoma. *J.Clin.Exp.Hematop.* 2014;54:23-30.
34. Yildiz M, Li H, Bernard D et al. Activating STAT6 mutations in follicular lymphoma. *Blood* 2015;125:668-679.
35. Lenz G, Davis RE, Ngo VN et al. Oncogenic CARD11 mutations in human diffuse large B cell lymphoma. *Science* 2008;319:1676-1679.
36. Karube K, Martinez D, Royo C et al. Recurrent mutations of NOTCH genes in follicular lymphoma identify a distinctive subset of tumours. *J.Pathol.* 2014;234:423-430.
37. Devan J, Janikova A, Mraz M. New concepts in follicular lymphoma biology: From BCL2 to epigenetic regulators and non-coding RNAs. *Semin.Oncol.* 2018
38. Kuppers R, Stevenson FK. Critical influences on the pathogenesis of follicular lymphoma. *Blood* 2018;131:2297-2306.
39. Zamo A, Pischmarov J, Schlesner M et al. Differences between BCL2-break positive and negative follicular lymphoma unraveled by whole-exome sequencing. *Leukemia* 2018;32:685-693.
40. Rosenquist R, Bea S, Du MQ, Nadel B, Pan-Hammarstrom Q. Genetic landscape and deregulated pathways in B-cell lymphoid malignancies. *J.Intern.Med.* 2017;282:371-394.
41. Koues OI, Kowalewski RA, Chang LW et al. Enhancer sequence variants and transcription-factor deregulation synergize to construct pathogenic regulatory circuits in B-cell lymphoma. *Immunity.* 2015;42:186-198.

42. Green MR, Kihira S, Liu CL et al. Mutations in early follicular lymphoma progenitors are associated with suppressed antigen presentation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2015;112:E1116-E1125.
43. Araf S, Okosun J, Koniali L, Fitzgibbon J, Heward J. Epigenetic dysregulation in follicular lymphoma. *Epigenomics*. 2016;8:77-84.
44. Zhang J, Vlasevska S, Wells VA et al. The CREBBP Acetyltransferase Is a Haploinsufficient Tumor Suppressor in B-cell Lymphoma. *Cancer Discov*. 2017;7:322-337.
45. Huet S, Szafer-Glusman E, Xerri L et al. Evaluation of clinicogenetic risk models for outcome of follicular lymphoma patients in the PRIMA trial [abstract]. *Hematol.Oncol*. 2017;35:96-97.
46. Bodor C, Grossmann V, Popov N et al. EZH2 mutations are frequent and represent an early event in follicular lymphoma. *Blood* 2013;122:3165-3168.
47. Weigert O, Weinstock DM. The promises and challenges of using gene mutations for patient stratification in follicular lymphoma. *Blood* 2017;130:1491-1498.
48. Huet S, Xerri L, Tesson B et al. EZH2 alterations in follicular lymphoma: biological and clinical correlations. *Blood Cancer J*. 2017;7:e555.
49. Stevens WBC, Mendeville M, Redd R et al. Prognostic relevance of CD163 and CD8 combined with EZH2 and gain of chromosome 18 in follicular lymphoma: a study by the Lunenburg Lymphoma Biomarker Consortium. *Haematologica* 2017;102:1413-1423.
50. Qu X, Li H, Braziel RM et al. Genomic alterations important for the prognosis in patients with follicular lymphoma treated on SWOG study S0016. *Blood* 2018
51. Puente XS, Bea S, Valdes-Mas R et al. Non-coding recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature* 2015;526:519-524.
52. Papaemmanuil E, Gerstung M, Malcovati L et al. Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. *Blood* 2013;122:3616-3627.

MATERIAL SUPLEMENTARIO - Tablas Suplementarias:

Tabla Suplementaria S1. Tabla comparativa de las variantes detectadas en los 5 casos secuenciados en paralelo por ambas tecnologías, amplicones y captura, y sus correspondientes frecuencias alélicas (VAF).

CASO	Tipo de muestra (infiltración)	AMPLICONES					CAPTURA				
		GEN	Variante (nt)	Variante (AA)	Lecturas totales	VAF (%)	VAF (%)	Lecturas totales	Variante (AA)	Variante (nt)	GEN
12-4110 LF	ADN de adenopatía (66% tumorales)	BCL2	c.175C>G	p.Pro59Ala	467	31,97	34,53	666	p.Pro59Ala	c.175C>G	BCL2
		CREBBP	c.4507T>A	p.Tyr1503Asn	3825	69,80	67,13	2574	p.Tyr1503Asn	c.4507T>A	CREBBP
		IRF8	c.1267C>T	p.Gln423Ter	7112	51,60	47,67	1418	p.Gln423Ter	c.1267C>T	IRF8
		SPEN	c.6021T>A	p.Asp2007Glu	4137	49,28	50,59	593	p.Asp2007Glu	c.6021T>A	SPEN
		-	-	-	-	-	46,85	542	p.Gly2493Glu	c.7478G>A	KMT2D
12-2684 LF	ADN de adenopatía (65% tumorales)	-	-	-	-	-	29,11	1058	p.Ser2910ArgfsTer32	c.8727_8730delAAGT	KMT2D
		DTX1	c.106T>G	p.Leu69Arg	504	20,27	22,57	2415	p.Leu69Arg	c.106T>G	DTX1
		NOTCH2	c.4568A>C	p.Asn1523Ser	157	62,42	48,92	1161	p.Asn1523Ser	c.4568A>C	NOTCH2
		SMARCA4	c.3484G>A	p.Gly1162Ser	1057	25,45	28,93	1946	p.Gly1162Ser	c.3484G>A	SMARCA4
		-	-	-	-	-	44,67	1064	p.Gly531Ser	c.1591G>A	CIITA*
13-8142 LF	ADN de adenopatía (80% tumorales)	CARD11	c.1070A>T	p.Asp357Val	8362	44,96	32,47	1352	p.Asp357Val	c.1070A>T	CARD11
		CREBBP	c.3909_3910dupTT	p.Ser1304PhefsTer10	2278	71,60	71,86	686	p.Ser1304PhefsTer10	c.3909_3910dupTT	CREBBP
		HIST1H1C	c.195_196delGT	p.Leu66GlyfsTer6	2385	11,66	29,52	2537	p.Leu66GlyfsTer6	c.195_196delGT	HIST1H1C
		IRF8	c.1247delC	p.Ser416TyrfTer37	10272	35,46	32,91	1410	p.Ser416TyrfTer37	c.1247delC	IRF8
		-	-	-	-	-	44,21	338	p.Gln50Pro	c.149A>C	FBXO11
05-1280 LDCBG	ADN de adenopatía (76% tumorales)	-	-	-	-	-	32,07	1486	p.GI184Glu	c.551G>A	GNAI2
		HIST1H1B	c.82G>C	p.Ala28Pro	1103	56,08	62,767	1768	p.Ala28Pro	c.82G>C	HIST1H1B
		NOTCH1	c.6520A>T	p.Lys2174Ter	2392	38,72	40,28	1229	p.Lys2174Ter	c.6520A>T	NOTCH1
		TBL1XR1	c.1454G>A	p.Gly485Glu	1154	82,87	82,34	1812	p.Gly485Glu	c.1454G>A	TBL1XR1
		TP53	c.637C>T	p.Arg213Ter	527	73,43	75,44	1881	p.Arg213Ter	c.637C>T	TP53

Tabla Suplementaria S1. (Continuación)

CASO	Tipo de muestra (infiltración)	AMPLICONES					CAPTURAS				
		GEN	Variante (nt)	Variante (AA)	Lecturas totales	VAF (%)	VAF (%)	Lecturas totales	Variante (AA)	Variante (nt)	GEN
10-5744 LDCBG	ADN de adenopatía (82% tumorales)	CDKN2A	c.329G>A	p.Trp110Ter	1069	85,87	86,72	875	p.Trp110Ter	c.329G>A	CDKN2A
		CREBBP	c.2728A>G	p.Thr910Ala	439	57,11	48,76	1700	p.Thr910Ala	c.2728A>G	CREBBP
		CREBBP	c.5394G>A	p.Met1798Ile	1312	76,60	74,21	1008	p.Met1798Ile	c.5394G>A	CREBBP
		DTX1	c.173G>A	p.Gly58Asp	429	40,32	43,43	1934	p.Gly58Asp	c.173G>A	DTX1
		EP300	c.2773C>A	p.Pro925Thr	2428	44,81	50,41	1093	p.Pro925Thr	c.2773C>A	EP300
		IRF8	c.1279_1280insTT	p.Ter427Phe	2870	43,76	39,00	1441	p.Ter427Phe	c.1279_1280insTT	IRF8
		MYD88	c.818T>C	p.Leu273Pro	5429	41,28	44,70	1434	p.Leu273Pro	c.818T>C	MYD88
		PIM1	c.370C>T	p.Pro124Ser	707	50,92	36,44	1148	p.Pro124Ser	c.370C>T	PIM1
		PIM1	c.384G>T	p.Gln128His	721	50,21	37,71	1197	p.Gln128His	c.384G>T	PIM1
		-	-	-	-	-	37,10	1364	p.Arg148His	c.443G>A	PIM1
-	-	-	-	-	38,72	1591	p.Phe1508LeufsTer10	c.4522_4523delTT	EP300		
Profundidad de cobertura media ± SD (rango)		2547.3x ± 2726.2 (rango: 157x-10272x)					1378.1x ± 561.4 (rango: 338-2574)				

*Gen ausente en el diseño de amplicones, no comparable.

En color verde se reflejan las variantes identificadas en la muestra no tumoral del paciente, asumidas como variantes germinales. AA, aminoácido; LDCBG, linfoma difuso de célula B grande; LF, linfoma folicular; nt, nucleótido; VAF, frecuencia alélica de la variante alterada.

Tabla Suplementaria S2. Características clínico-biológicas de los pacientes incluidos en el capítulo 2 en función de presentar menos de 6 genes alterados (n=53) ó 6 o más genes alterados (n=30).

Variable	< 6 genes alterados, n (%)	≥ 6 genes alterados, n (%)	P
Mediana de seguimiento, meses (rango)	72.5 (5-236)	70 (6-220)	ns
Edad, años (mediana, rango)	56 (19-84)	72 (35-86)	ns
Sexo M/H	28 (53) / 25 (47)	18 (60) / 12 (40)	ns
Grado histológico*			
1	22 (43.1)	8 (28.6)	ns
2	24 (47.1)	16 (57.1)	ns
3A	5 (9.8)	14 (44.3)	ns
FLIPI*			
0-1 (Bajo riesgo)	15 (31.3)	9 (33.3)	ns
2 (Riesgo intermedio)	11 (22.9)	6 (22.2)	ns
3-5 (Alto riesgo)	22 (45.8)	12 (44.4)	ns
Ann Arbor*			
I	6 (13.0)	4 (16.0)	ns
II	4 (8.7)	5 (20.0)	ns
III	2 (4.3)	5 (20.0)	ns
IV	34 (73.9)	11 (44.0)	ns
Positivos para la t(14;18)	42 (79.2)	27 (90.0)	ns
Terapia en primera línea			
Nunca tratados	6 (11.3)	4 (13.3)	ns
Cuidados paliativos	2 (3.8)	2 (6.7)	ns
IQT basada en rituximab	30 (56.6)	17 (56.7)	ns
R-CHOP	22 (73.3)	11 (64.7)	ns
R-Bendamustina	2 (6.7)	1 (5.9)	ns
R-CVP	1 (3.3)	2 (11.8)	ns
R-FC	3 (10.0)	1 (5.9)	ns
R-Lenalidomida	2 (6.7)	2 (11.8)	ns
QT sin rituximab	10 (18.9)	3 (10.0)	ns
CHOP	9 (90.0)	2 (66.7)	ns
Otros	1 (10.0)	1 (33.3)	ns
Radioterapia sola o con rituximab	3 (5.7)	3 (10.0)	ns
Rituximab en monoterapia	2 (3.8)	1 (3.3)	ns
Mantenimiento con rituximab*	25 (61)	12 (63.2)	ns

*<6 genes alterados: Dato de grado histológico disponible para 51 (96%) pacientes; FLIPI disponible para 48 (91%) pacientes; Ann Arbor disponible para 46 (87%) pacientes; Mantenimiento calculado para 41 (77%) pacientes.

≥6 genes alterados: Dato de grado histológico disponible para 28 (93%) pacientes; FLIPI disponible para 27 (90%) pacientes; Ann Arbor disponible para 25 (83%) pacientes; Mantenimiento calculado para 19 (63.3%) pacientes.

CHOP, ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, prednisona; CVP, ciclofosfamida, vincristina, prednisona; FLIPI, Índice pronóstico internacional del LF; IQT, Inmunoquimioterapia; QT, Quimioterapia; R, rituximab.

MATERIAL SUPLEMENTARIO - Figuras Suplementarias:

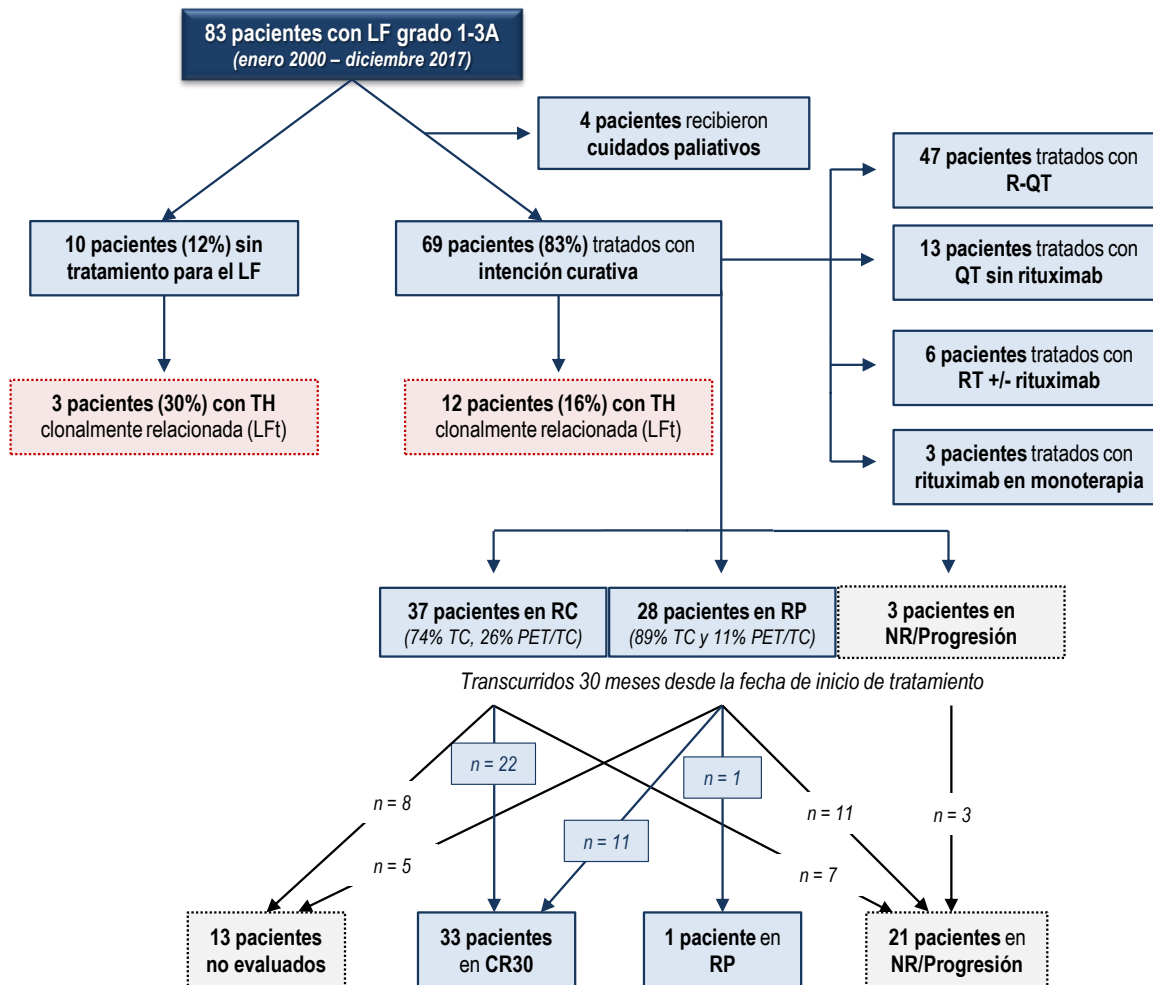
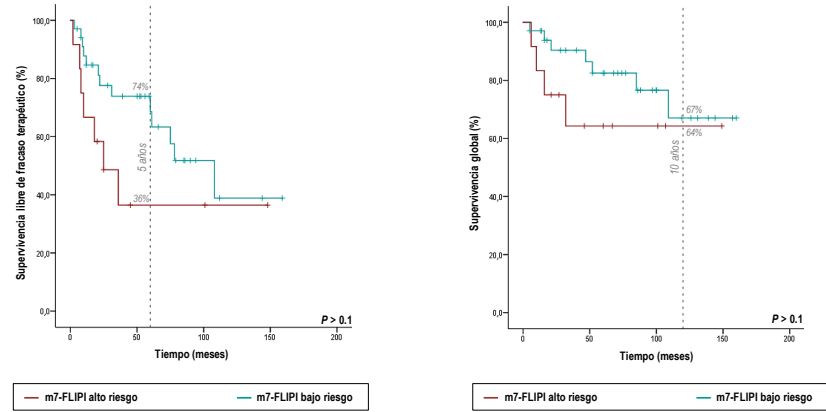


Figura Suplementaria S1. Diagrama de flujo que esquematiza la evolución clínica de los 83 pacientes con LF incluidos en el capítulo 2 de la presente tesis doctoral. CR30, respuesta completa a los 30 meses; LF, linfoma folicular; LFt, linfoma folicular transformado; NR, no respuesta; QT, quimioterapia; R-IQT, inmunquimioterapia basada en rituximab; RC, respuesta completa; RP, respuesta parcial; RT, radioterapia; TC, tomografía computerizada; PET tomografía por emisión de positrones; TH, transformación histológica.

A. Modelo clínico-genético m7-FLIPI



B. Índice pronóstico FLIPI

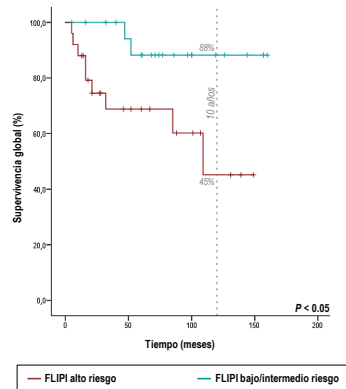


Figura Suplementaria S2. Análisis *Kaplan-Meier* de la supervivencia libre de fracaso terapéutico (SLFT) a 5 años y supervivencia global (SG) a 10 años en los pacientes con linfoma folicular tratados con R-IQT (LF, n=47) en función del (A) modelo de riesgo clínico-genético m7-FLIPI o (B) el índice pronóstico FLIPI en el momento del diagnóstico. Los pacientes clasificados en el grupo de alto riesgo se representan con una línea granate, mientras que aquellos de bajo/intermedio riesgo son representados con una línea azul. La línea vertical discontinua indica 5 o 10 años de seguimiento en función de que se hable de SLFT o SG, respectivamente.

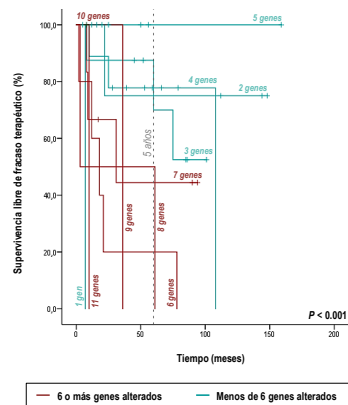


Figura Suplementaria S3. Análisis *Kaplan-Meier* de la supervivencia libre de fracaso terapéutico (SLFT) a 5 años en los pacientes con linfoma folicular tratados con R-IQT (LF, n=47) en función del número de genes alterados en el momento del diagnóstico. Los pacientes con alteraciones en 6 o más genes se representan con una línea granate, mientras que aquellos con alteraciones en menos de 6 genes son representados con una línea azul. La línea vertical discontinua indica 5 años de seguimiento.

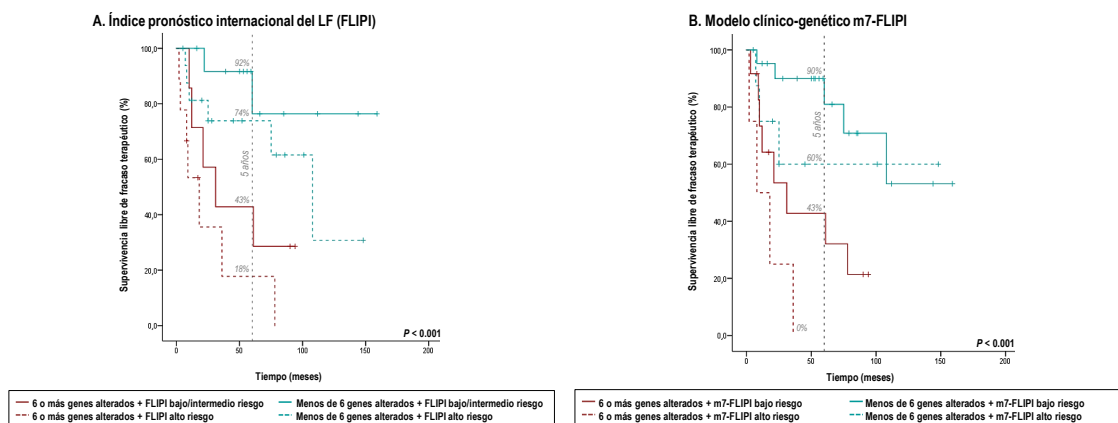


Figura Suplementaria S4. Análisis *Kaplan-Meier* de la supervivencia libre de fracaso terapéutico (SLFT) a 5 años en los pacientes con linfoma folicular tratados con R-IQT (LF, n=47) en función del número de genes alterados en el momento del diagnóstico y (A) el índice pronóstico internacional del linfoma folicular (FLIPI) o (B) el modelo de riesgo clínico-genético m7-FLIPI. Los pacientes con alteraciones en 6 o más genes se representan con una línea granate, mientras que aquellos con alteraciones en menos de 6 genes son representados con una línea azul. En ambos casos, el grupo de alto riesgo es representado mediante línea discontinua del color correspondiente. La línea vertical discontinua indica 5 años de seguimiento.

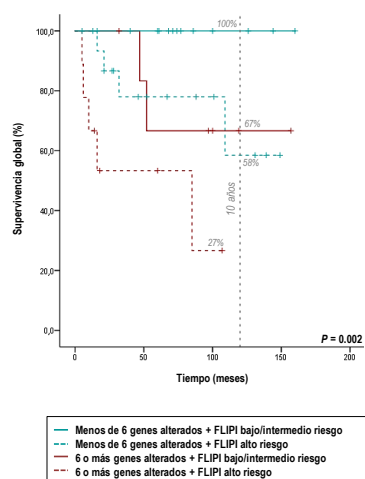


Figura Suplementaria S5. Análisis *Kaplan-Meier* de la supervivencia global (SG) a 10 años en los pacientes con linfoma folicular tratados con R-IQT (LF, n=47) en función del número de genes alterados en el momento del diagnóstico y el índice pronóstico FLIPI. Los pacientes con alteraciones en 6 o más genes se representan con una línea granate, discontinua para aquellos que además presentan FLIPI de alto riesgo, mientras que aquellos con alteraciones en menos de 6 genes son representados con una línea azul, discontinua para aquellos que además presentan FLIPI de alto riesgo. La línea vertical discontinua indica 10 años de seguimiento.

CAPÍTULO 3

Estudio molecular de la progresión y transformación histológica del linfoma folicular a linfoma agresivo. Posibles modelos de evolución clonal en base a la experiencia de un solo centro.

RESUMEN

Introducción: El 25-30% de los pacientes con linfoma folicular (LF) experimentan transformación histológica (TH) a linfoma agresivo, generalmente linfoma difuso de célula B grande (LDCBG). La tasa de TH es del 2-3% por año y es considerado uno de los eventos de peor pronóstico para estos pacientes, ya que la curación con terapia convencional es poco frecuente. La patogénesis de este proceso no es bien conocida pese a que las técnicas de secuenciación masiva (NGS) permiten conocer factores de riesgo del proceso de TH como la activación de *MYC* o inactivación de los genes supresores de tumores *CDKN2A/B* y *TP53*. Estos eventos no son exclusivos de la TH, ya que también se han observado en la progresión del LF. Se ha postulado además la participación de otros genes en la TH como *B2M*, *CD58*, *MYD88* o *POU2AF1*, si bien hay gran variabilidad entre estudios.

Conocer el patrón de evolución del clon tumoral responsable tanto de la TH como de la progresión y/o recaídas recurrentes que caracterizan al LF podría facilitar un mejor conocimiento de la biología y patogenia de esta enfermedad. Se ha postulado dos modelos de evolución clonal: i) lineal, con acumulación progresiva de lesiones genéticas, y ii) divergente, a partir de un clon progenitor común (CPC) que va adquiriendo alteraciones propias y características de cada uno de los clones dominantes en cada etapa de la enfermedad. Sin embargo, la mayoría de estudios consideran solo una muestra representativa del LF y otra de la TH, sin análisis del resto de episodios de la enfermedad, limitando la información del modelo de evolución clonal.

Objetivos: Estudiar en detalle las alteraciones genéticas en cada uno de los episodios de la enfermedad (diagnóstico-recaída-transformación) en pacientes que sufren TH de LF a linfoma agresivo, para identificar algún biomarcador que caracterice a este grupo de pacientes, y plantear posibles modelos de evolución clonal. Las alteraciones presentes en el LF transformado se compararán con una serie de pacientes sin TH con un seguimiento mínimo de 5 años (n=32) y con LDCBG *de novo* (n=30).

Pacientes y métodos: Se analizaron 16 pacientes con LF grado 1-3A que presentaron TH confirmada y muestra pareada LF-TH. En todos los casos se incluyó también muestra no tumoral pareada, y en 9 de ellos además muestra del momento de la recaída histológica como LF. Se estudió la región codificante de 66 genes, descritos en la literatura como relevantes en patología linfoide, mediante dos paneles de NGS de diseño propio

basados en tecnología de amplicones y captura, comparables entre sí. La secuenciación, análisis primario y análisis secundario se realizaron en un MiSeq (Illumina Inc.), y la anotación y filtrado de variantes se llevó a cabo con el software *BaseSpace Variant Interpreter* (Illumina Inc.), considerando aquellas con un número de lecturas superior a 100x y una frecuencia mínima de lecturas con la variante (VAF) del 5%.

Resultados: Hubo un aumento tanto en el número de genes alterados como de mutaciones al comparar las biopsias del diagnóstico con las del resto de episodios de la enfermedad. Los genes más comúnmente alterados en todos los episodios fueron *CREBBP* y *KMT2D*, presentes en todos los pacientes analizados, además de *EZH2*, *BCL2*, *TNFRSF14*, *STAT6*, *ARID1A*, *IRF8* y *FOXO1*. En el análisis multivariante, las alteraciones en *FOXO1* y el índice FLIPI fueron predictores de TH precoz de forma independiente.

Por otro lado, se observaron alteraciones adquiridas en determinados momentos de la enfermedad, principalmente en genes relacionados con el ciclo celular. Es el caso de *TP53* y *CCND3*, presentes recurrentemente en la TH, con *TP53* alterado en un elevado porcentaje de casos en la recaída del LF. Otros genes, como *MYD88*, que han sido asociados a la TH, se observaron en etapas previas, sobre todo recaídas del LF. Otro hallazgo relevante fue la presencia de alteraciones en *KRAS*, *NRAS* y *RHOA* en la TH que no se observaron en el resto de etapas, ni tampoco en los pacientes con LF sin TH o LDCBG *de novo*.

Con estos datos, se establecieron dos modelos de evolución clonal: lineal o secuencial (54% de los casos) y divergente o ramificada (46%), cada uno de ellos con determinadas variantes. Las biopsias secuenciales demostraron la existencia en ambos modelos de un CPC con alteraciones en *CREBBP* y/o *KMT2D*, además de la t(14;18) presente en el 75% de los pacientes con TH. Dentro de cada modelo fueron detectadas variantes en función del origen de los clones responsables o dominantes en cada episodio de la enfermedad. No hubo diferencias significativas en la distribución de genes y las características clínicas entre los dos modelos.

Discusión y conclusiones: Se detectaron alteraciones específicas de fase que parecen mostrar un papel en la patogénesis de la TH, incluyendo alteraciones exclusivas no descritas en estudios previos (*KRAS*, *NRAS*, *RHOA*), incidiendo en la relevancia de la alteración del ciclo celular en la TH. De igual forma que en otras series, no se identificó un marcador o evento genético único responsable de la TH del LF a linfoma agresivo. Pese a ello, las alteraciones en *FOXO1* podrían ser un factor predictor de TH precoz. En el estudio se confirmó la existencia de dos modelos de evolución clonal, lineal y divergente, a partir de un CPC que podría ser el responsable de la naturaleza incurable característica del LF. La inclusión de muestras de la recaída del LF ha permitido identificar nuevas variantes dentro de los mismos, sin que se observen diferencias clínicas o biológicas entre los modelos. En conjunto, estos resultados ponen de manifiesto la complejidad genética característica de la patogenia del LF y su TH a linfoma agresivo, lo que sugiere la existencia de varios mecanismos que desencadenen la evolución del clon tumoral.

INTRODUCCIÓN

En el curso natural del linfoma folicular (LF), el 25-30% de los pacientes sufren una transformación histológica (TH) a linfoma agresivo, principalmente linfoma difuso de célula B grande (LDCBG).^{1,2} La tasa de TH es del 2-3% por año sin alcanzar un plató o reducir el riesgo a lo largo del tiempo, contando además con un grupo reducido de pacientes que presentan TH en el momento del diagnóstico.³⁻⁶ Este proceso es considerado uno de los eventos de peor pronóstico del LF, debido a la baja probabilidad de curación con las terapias convencionales y su peor supervivencia comparada con la de los pacientes sin transformación.^{7,8} Varios estudios que evalúan factores clínicos han permitido identificar que aquellos pacientes con FLIPI alto en el momento del diagnóstico tienen mayor riesgo de TH,^{7,9,10} aunque aún existe un porcentaje de pacientes con FLIPI alto que no se transforman, y casos con FLIPI bajo que sí lo hacen. Por tanto, la caracterización biológica de la TH podría ayudar a entender mejor el mecanismo por el que tiene lugar este proceso.

En la última década, gracias a la incorporación de las técnicas de secuenciación de nueva generación (NGS, por sus siglas en inglés), varios estudios han puesto de manifiesto la complejidad del proceso de TH, que engloba mecanismos genómicos, transcripcionales y epigenéticos, aportando nuevos datos clínicos y moleculares implicados en este fenómeno. Esto ha permitido definir que el perfil genético de la TH es más semejante al subtipo CGB del LDCBG.¹¹ Asimismo, se ha observado que el patrón de alteraciones difiere de acuerdo a la célula de origen de la TH.¹² Varios estudios concuerdan en que la TH se asocia con la activación del oncogen *MYC*, principalmente debido a reordenamientos estructurales, y con inactivación, generalmente por delección, de los genes supresores tumorales *CDKN2A/B* y *TP53*, siendo todos eventos conductores o *drivers* de la transformación.^{13,14} Sin embargo, aun siendo característicos de la TH, estos eventos también se observan en la progresión del LF.¹⁵ Además, varios estudios han reportado una frecuencia elevada de mutaciones puntuales en el momento de la transformación en genes conocidos, tales como *B2M*, *BCL2*, *CD58*, *DTX1*, *HIST1H1E*, *MYD88*, *NOTCH2* y *TNFAIP3*, u otros más recientemente descritos como *LRP1B*, *P2RY8*, *POU2AF1*, *S1PR2* y *UBE2A*, e incluso, se ha visto una asociación con mayor riesgo o menor tiempo hasta la TH en algunos casos.^{9,11;13;14;16-18} Sin embargo, la mayoría de estos estudios han considerado cualquier muestra de la etapa indolente de la enfermedad, restringiendo sus conclusiones. Actualmente, ninguno de estos marcadores biológicos se ha validado lo suficiente como para justificar su aplicación fuera del ámbito de la investigación y, por tanto, no están implementados en la práctica clínica diaria.¹³ Hasta la fecha, no existe un biomarcador robusto que permita predecir la transformación en el momento del diagnóstico, por lo que sigue siendo un desafío.

Por todo lo descrito previamente, es asumible que puedan existir diferentes mecanismos que desencadenen la transformación. En este sentido, se han descrito dos modelos de evolución del clon tumoral responsable del LF hasta la TH. Por una parte, el modelo tradicional de acumulación gradual de lesiones genéticas o evolución lineal y, por otra, el modelo alternativo conocido como evolución clonal divergente o ramificada a partir de un clon progenitor común o ancestral (CPC) y, en algunos casos, como consecuencia del crecimiento de un subclon indetectable en la biopsia del LF inicial.^{9;11;14;16} La mayoría de estos estudios están limitados por haber evaluado únicamente una muestra representativa del LF y otra de la TH, y no muestras de las recaídas histológicas como LF, lo que puede suponer la pérdida de información respecto al patrón de evolución del clon.

Por todo ello, comprender en profundidad la biología y la evolución del clon tumoral ayudará a identificar marcadores o eventos que caractericen el proceso de transformación, permitiendo abrir nuevas vías de investigación en busca de estrategias para su prevención. Con el objetivo de comprender mejor la patogenia y biología de este proceso, se planteó el análisis genético detallado de los casos con LF de nuestro centro que sufren TH con muestra pareada en el momento del diagnóstico y de la TH, así como de todas las recaídas intermedias del LF si las hubiera, planteando modelos de evolución clonal que consideran todas las etapas de la enfermedad.

RESULTADOS

1. Características de los pacientes

▪ Características clínico-biológicas

Se llevó a cabo el estudio de 16 pacientes diagnosticados entre enero de 1995 y febrero de 2012 de LF grado 1-3A, confirmado histológicamente de acuerdo a la clasificación de la OMS de 2017, que experimentaron transformación histológica (TH) con relación clonal confirmada mediante el estudio del reordenamiento V(D)J (BIOMED-2) o *breakpoint* de la t(14;18).² Fueron excluidos los pacientes con histología compuesta (LF+LDCBG) o LF grado 3B en el momento del diagnóstico.¹⁹

Las características clínico-biológicas en el momento del diagnóstico de la serie de pacientes (n=16) se detallan en la Tabla 1. En ella podemos observar que la mediana de edad en el momento del diagnóstico fue 54 años (intervalo, 33-80), de los cuales el 63% eran mujeres (n=10). La mitad de la serie (50%) se presentó como LF grado 1 en el momento del diagnóstico y sólo uno mostró grado 3A. En cuanto a la distribución de pacientes con LF de acuerdo al índice pronóstico FLIPI, el 50% del total de casos (n=7) fueron clasificados en el grupo de bajo riesgo, mientras que el 29% (n=4) se encontraron en el grupo de alto riesgo en el momento del diagnóstico. El 75% de los pacientes presentaron estadio IV de Ann Arbor al ser diagnosticados, y sólo 4 pacientes (25%) fueron negativos para la t(14;18).

Del total de pacientes incluidos en este capítulo, 3 pacientes (19%) no habían recibido tratamiento para el LF hasta el momento de la TH a linfoma agresivo. Los 13 pacientes restantes (81%) recibieron tratamiento con intención curativa para el LF durante su enfermedad, siete de los cuales (54%) fueron tratados con esquemas inmunoterápicos basados en rituximab (R-IQT). Dentro de este grupo tratado con R-IQT, el tratamiento de elección en primera línea fue R-CHOP, aplicado en 5/7 pacientes. Los 6 pacientes restantes recibieron esquemas quimioterápicos sin rituximab, principalmente CHOP (5/6 pacientes). Tras finalizar el tratamiento de inducción en primera línea, sólo 3 pacientes recibieron tratamiento de mantenimiento con rituximab en dosis 375 mg/m² cada dos meses durante dos años.

▪ Evolución clínica de la serie

En la serie global de pacientes con LF que experimentan TH, tras una mediana de seguimiento de 11.4 años (intervalo, 5.8-19.7 años) para los pacientes vivos, 5 pacientes murieron por persistencia o progresión de su enfermedad. La mediana de tiempo hasta la transformación (TTT) fue de 6.1 años (intervalo, 0.3-19.6 años), siendo la supervivencia global (SG) de la serie a 5 y 10 años del 81% y 66%, respectivamente. Del total de

casos, 13 pacientes se transformaron a LDCBG (81%) y 3 a LF grado 3B (19%). Tras aplicar el algoritmo de Hans en la biopsia transformada,²⁰ 10 de los 16 pacientes (62.5%) con LF mostraron TH a subtipo CGB, mientras que 4 pacientes (25%) lo hicieron a no-CGB, dos de ellos negativos para la t(14;18). En los dos casos restantes, la ausencia de algún marcador inmunohistoquímico hizo imposible su cálculo.

Tabla 1. Características clínico-biológicas de los pacientes incluidos en el capítulo 3 (n=16).

Variable	Serie capítulo 3, n (%)
Edad, años (mediana, intervalo)	53.5 (33-80)
Sexo M/H	10 (63) / 6 (37)
Grado histológico	
1	8 (50)
2	7 (43.8)
3A	1 (6.2)
FLIPI*	
0-1 (Bajo riesgo)	7 (50)
2 (Riesgo intermedio)	3 (21.4)
3-5 (Alto riesgo)	4 (28.6)
Ann Arbor	
I	2 (12.5)
II	2 (12.5)
III	0 (0)
IV	12 (75)
Positivos para la t(14;18)	12 (75)
Terapia en primera línea	
Nunca tratados	3 (18.8)
IQT basada en rituximab	7 (43.8)
R-CHOP	5 (71.4)
R-Bendamustina	1 (14.3)
R-FMD	1 (14.3)
QT sin rituximab	6 (37.5)
CHOP	5 (83.3)
Otros	1 (16.7)
Mantenimiento con rituximab*	3 (27.3)

*Dato de FLIPI disponible para 14 (88%) pacientes; Mantenimiento calculado para 11 (69%) pacientes. CHOP, ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, prednisona; FLIPI, Índice pronóstico internacional del LF; IQT, Inmunoterapia; QT, Quimioterapia; R, rituximab.

Dentro del grupo de pacientes que recibieron tratamiento (n=13) para el LF, 7 pacientes alcanzaron respuesta completa (RC) tras la inducción, 4 pacientes (31%) hicieron respuesta parcial (RP) y 2 casos (15%) progresaron o se transformaron, clasificados como no respuesta y/o progresión (NR/Progresión). En todos los casos la evaluación de la respuesta se hizo mediante TC. Transcurridos 30 meses desde la fecha de inicio del tratamiento en primera línea, sólo 3 pacientes (23%) se encontraban en respuesta completa (CR30), y no

presentaron recaídas hasta la fecha de TH a los 6, 7 y 17 años desde el diagnóstico. La supervivencia libre de fracaso terapéutico (SLFT) a 5 y 10 años para los 13 pacientes que recibieron tratamiento fue del 31% y 15%, respectivamente.

▪ Episodios de la enfermedad estudiados

Los episodios de la enfermedad estudiados, así como la evolución de cada uno de los casos, se recogen en el cronograma representado en la Figura 1. Se estudió un total de 55 muestras, con muestra tumoral pareada en el momento del diagnóstico ($n=14$) y de la transformación a linfoma agresivo ($n=16$), confirmada histológicamente por el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario de Salamanca, así como muestra en 9 de los 13 pacientes que presentaron recaída histológica como LF. Además, en todos los casos se incluyó una muestra sin infiltración tumoral por técnicas de citometría de flujo ($n=16$), con el objetivo de excluir variantes presentes en la línea germinal del paciente.

Las 39 muestras tumorales provienen de 21 adenopatías o masas, 12 de tejido parafinado, 3 MO y 3 de otros tejidos. Los pacientes sin muestra tumoral disponible representativa del LF y/o TH fueron excluidos, del mismo modo que aquellos con muestra disponible de mala calidad, baja concentración y/o baja infiltración por técnicas de citometría de flujo. En total, se analizaron 23 muestras de ADN procedentes de biopsias con histología de bajo grado (LF grado 1-3A) y 16 muestras de ADN obtenidas de biopsias con histología de alto grado (LDCBG o LF grado 3B).

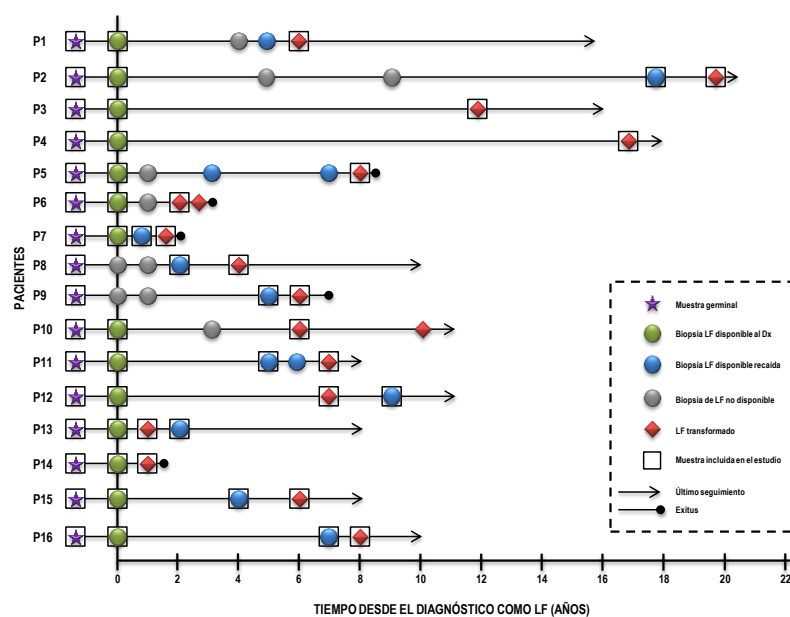


Figura 1. Cronograma ilustrativo de los episodios de la enfermedad estudiados en cada paciente con LFt ($n=16$), además de las biopsias incluidas en el análisis de los mismos. En la figura se pueden observar las etapas de la enfermedad en que se extraen las 39 biopsias tumorales analizadas en el presente capítulo, así como las 16 muestras no tumorales de SP o MO pareadas de todos los casos.

2. Calidad de la secuenciación masiva (NGS)

Las 55 muestras correspondientes a los 16 casos analizados fueron secuenciadas mediante el panel de NGS basado en la tecnología de amplicones *TruSeq Custom Amplicon v1.5* (Illumina Inc.) (n=15/55, 27.3%) y mediante el panel de NGS basado en la tecnología de captura *SeqCap EZ Choice Enrichment* (Roche NimbleGen Inc.) (n=40/55, 72.7%), ambos detallados en “Material y Métodos” (apartado 2.7.2) y comparados en el capítulo 2.

En el caso de las muestras secuenciadas mediante tecnología de amplicones, una media de 2 millones de lecturas superó los filtros de calidad propios de la plataforma de secuenciación, y el 92.9% fue la media de lecturas alineadas con el genoma de referencia que presentó un *Q score* en la escala de *Phred* mayor de 30 (Q30, precisión 99.9%). En este caso, la profundidad de cobertura media obtenida fue de 3232x (intervalo, 126x-29958x). En cuanto a las muestras secuenciadas mediante tecnología de captura, 4 millones de lecturas superaron los filtros de calidad propios de la plataforma de secuenciación, y una media de 97.6% de las lecturas alineadas presentaron un *Q score* mayor de 30. La profundidad de cobertura media observada en el caso de las muestras secuenciadas mediante captura fue inferior pero más uniforme, 1015x (intervalo, 129x-3681x), siendo el porcentaje medio de lecturas *on-target* o enriquecimiento del 96.5%. Durante el análisis se filtraron todas las variantes con una profundidad de cobertura por debajo de 100x y una frecuencia de la variante alterada (VAF) inferior al 5%, con la excepción de una muestra en que se filtraron las variantes con una VAF inferior al 1%, al presentar una infiltración tumoral del 8%.

3. Perfil mutacional del linfoma folicular transformado

Tras llevar a cabo la anotación y filtrado de variantes por su calidad y frecuencia en la población (ver apartado 2.7.4 de “Material y Métodos”), se detectaron 297 variantes no sinónimas en región codificante en las 39 muestras tumorales correspondientes a los 16 pacientes con TH. Del total de variantes, 45 fueron detectadas en las muestras no tumorales y fueron clasificadas como variantes germinales o presentes en la línea germinal de los pacientes, siendo excluidas del análisis. Por tanto, se detectaron 252 variantes somáticas, de las cuales 62 (24.6%) fueron variantes detectadas en las biopsias del diagnóstico (n=14), 64 (25.4%) en las biopsias correspondientes a las recaídas del LF (n=9) y 126 (50%) en las biopsias de la transformación (n=16). Dentro del grupo total de variantes, 162 (64.3%) fueron variantes de cambio de sentido o *missense*, 33 (13.1%) fueron ganancias de codón de *stop*, 43 (17.1%) fueron variantes con cambio de marco de lectura o *frameshift* (33 deleciones y 10 inserciones o duplicaciones), 9 (3.2%) fueron *indels* sin cambio de marco o *inframe* y 6 (2.4%) variantes afectaron al codón iniciador de la proteína (Figura Suplementaria S1). Las variantes somáticas

mostraron una distribución similar en cuanto al tipo de cambio (*missense, frameshift, inframe...*) entre las muestras procedentes del diagnóstico, recaída y TH.

Las variantes somáticas detectadas afectaron a 41 de los 66 genes estudiados (62.1%), siendo la VAF media general 28.6% (mediana, 28%; intervalo, 2.9%-99.7%). Para poder comparar la VAF entre los distintos episodios de la enfermedad analizados, esta fue corregida en función de la infiltración tumoral de la biopsia correspondiente observando diferencias significativas entre la mediana de la VAF corregida en el momento del diagnóstico (36.1%; intervalo, 6.6%-100%) y la observada tanto en la recaída (44.4%; intervalo, 16.3%-100%) como en la TH (45%; intervalo, 10.2%-100%) ($P < 0.001$). Sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas al comparar la VAF obtenida entre el momento de la recaída y la TH.

▪ **Alteraciones compartidas entre la etapa indolente y agresiva** (*Diagnóstico – Recaída – TH*)

Se clasificaron como alteraciones compartidas entre la etapa indolente y la etapa agresiva, aquellas presentes en los tres episodios de la enfermedad de los 14 pacientes con TH con biopsia disponible en todos ellos. En este contexto, los genes más frecuentes en la serie global de LF (frecuencia >10%, capítulo 2), *CREBBP*, *KMT2D*, *BCL2*, *TNFRSF14*, *EZH2*, *STAT6*, *ARID1A*, *FOXO1* e *IRF8*, aparecen representados en una incidencia similar en los tres momentos, de la misma forma que otros con incidencias inferiores (Figura 2A). Otros genes recurrentes en la serie global, como *CARD11*, *EP300*, *GNA13*, *SMARCA4* e *HIST1H1E*, no se observaron en ninguno de los 14 casos con TH en la biopsia del diagnóstico. Cabe destacar que *TNFRSF14* se adquirió en 5 casos durante la transformación, lo que se tradujo en una frecuencia del 28.6% en el momento del diagnóstico y del 50% en la TH.

Aquellos pacientes que presentaron alteraciones en los genes *CREBBP* y *KMT2D* en el momento del diagnóstico, las mantuvieron en las biopsias posteriores tanto de las recaídas del LF como de la TH a linfoma agresivo, en consistencia con la adquisición de estas alteraciones en etapas tempranas de la patogénesis del LF o en el clon progenitor común (CPC).^{11:16}

▪ **Alteraciones adquiridas durante la progresión de la enfermedad** (*Recaída – TH*)

Se clasificaron como alteraciones adquiridas aquellas identificadas durante la progresión de la enfermedad, ya sea en la recaída del LF o en la TH, que no estaban presentes en ninguno de los casos en el momento del diagnóstico. Las alteraciones adquiridas en la presente serie se reflejan en las Figuras 2B y 2C

El evento genético más común adquirido durante la progresión del linfoma fue la alteración del gen *TP53*. Se detectaron mutaciones puntuales y una delección de 2 nucleótidos en el gen supresor de tumores *TP53* en 5/16 pacientes (31.2%) en la biopsia de la TH, que no estaban presentes al diagnóstico. En dos casos, la

mutación ya estaba presente en la recaída del LF, mientras que un tercer caso presentó una mutación en la recaída que no se observó en la TH, sumando 3/9 pacientes (33.3%) con alteraciones en *TP53* en el momento de la recaída del LF. Algunos genes descritos en previos estudios como característicos de la TH, se observaron alterados en el momento de la recaída del LF (Figura 2B).^{14;16} Es el caso por ejemplo de *MYD88*, alterado en 1/9 pacientes (11%) en la recaída del LF.

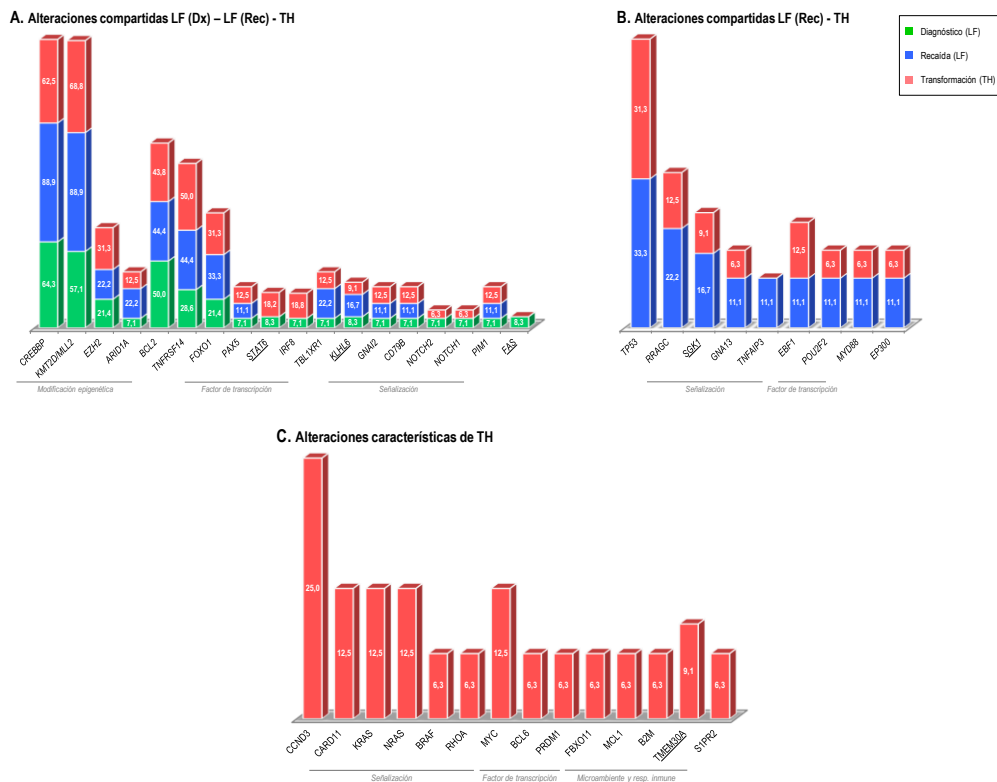


Figura 2. Distribución de los genes alterados en el LF con TH (n=16) entre los distintos episodios de la enfermedad. (A) Alteraciones compartidas entre la etapa indolente y la etapa agresiva, en genes principalmente involucrados en modificación epigenética. **(B)** Alteraciones ausentes en el momento del diagnóstico, pero compartidas entre las biopsias de la recaída del LF y las correspondientes a la TH a linfoma agresivo. **(C)** Alteraciones exclusivas del LF con TH, no observadas en ninguno de los casos en el momento del diagnóstico o recaída del LF. En todos los diagramas se observan a lo largo del eje X los genes que presentaron alteraciones, subrayados aquellos analizados sólo en los casos secuenciados mediante tecnología de captura. Cada una de las barras representa la frecuencia de un gen, dividida en tres, dos o un color en función de que presente alteraciones en los tres, dos o uno de los episodios de la enfermedad analizados, respectivamente. En color verde se representa el diagnóstico, en azul la recaída histológica como LF, y en rojo el momento de la TH a linfoma agresivo. LF, linfoma folicular; LFT, linfoma folicular transformado; Rec, recaída; TH, transformación histológica.

Cabe destacar la presencia de mutaciones puntuales en el gen *CCND3* en la biopsia de la TH en un cuarto de los pacientes (25%, 4/16 casos), estando ausentes en las biopsias correspondientes al LF tanto en el momento del diagnóstico como en las recaídas (Figura 2C). Este gen codifica la ciclina D3, una proteína que regula la transición entre las fases G1/S del ciclo celular. Esta categoría funcional incluye los genes (*CCND3*, *TP53*) más recurrentemente adquiridos durante la TH y, por tanto, es la categoría alterada con mayor frecuencia,

ya que se observan en la mitad de los casos analizados (8/16 pacientes). Además, se observaron mutaciones adquiridas en los genes *KRAS*, *NRAS* y *RHOA* en 2 (2/16, 12.5%), y 1 caso (1/16, 6.3%), respectivamente, ausentes en la serie global de LF. Estos genes codifican GTPasas pertenecientes a familias homólogas, involucradas en múltiples procesos, entre ellos proliferación celular, enmarcados por tanto en la categoría funcional de señalización celular. La siguiente en frecuencia fue la categoría funcional de genes codificantes de factores de transcripción donde se encuentran alterados algunos ya descritos en TH, como *MYC* (12.5%, 2/16 casos) y *BCL6* (6.2%, 1/16 casos).

4. Análisis comparativo del perfil mutacional

Con el objetivo de determinar si el LF con TH representa una enfermedad patogénicamente distinta del LF y/o del LDCBG *de novo*, se llevó a cabo un análisis comparativo de su perfil mutacional con dos grupos bien diferenciados: i) pacientes con LF sin TH y seguimiento mínimo de 5 años (n=32) y, ii) pacientes con LDCBG de nuevo diagnóstico (n=30). En todos los casos se llevó a cabo la secuenciación masiva utilizando los mismos paneles de NGS detallados en “Material y Métodos” (apartado 2.7.2). Se secuenciaron 41 casos mediante tecnología de amplicones y 26 mediante tecnología de captura.

▪ Comparación con LF sin TH

Se incluyeron en el análisis comparativo los pacientes con LF analizados en el capítulo 2 de la presente tesis doctoral que, en un mínimo de seguimiento de 5 años, no sufrieron transformación a linfoma agresivo (n=32). De estos 32 pacientes, 13 fueron secuenciados mediante tecnología de amplicones con una profundidad de cobertura media de 2709x (intervalo, 101x-16558x), y 19 mediante tecnología de captura con una profundidad media de 937x (intervalo, 121x-3243x). En todos los casos la secuenciación masiva se llevó a cabo en la biopsia del momento del diagnóstico como LF, siendo la VAF media 32.4% (mediana, 29.1%; intervalo, 5.1%-80.3%).

Tras comparar el perfil mutacional del grupo de pacientes con LF sin TH con el correspondiente al momento del diagnóstico de aquellos pacientes con TH (n=14/16 casos), se observó como todos los genes alterados en los pacientes con TH también aparecieron alterados en el LF sin TH, con la excepción de *KLHL6*, ya que sólo estuvo mutado en un caso. Se observó una frecuencia mayor de alteración en *BCL2* (50% vs. 21.9%) y *FOXO 1* (21.4% vs. 9.4%), e inferior en *STAT6* (8.3% vs. 31.6%) en los casos con TH respecto al LF sin TH (Figura Suplementaria S2). En ninguno de los casos las diferencias fueron estadísticamente significativas, aunque el número de casos a comparar fue reducido.

Cabe resaltar la presencia de alteraciones en los genes *CARD11* (21.9%), *GNA13* (15.6%) y *SMARCA4* (15.6%) y *SPEN* (15.6%) en el LF sin TH que no se observaron en ninguno de los casos con TH en el momento

del diagnóstico (Figura Suplementaria S2), alguno de ellos descrito previamente como recurrente en el LF.²¹⁻²³ Además, genes adquiridos en la muestra de la TH como *CCND3*, *KRAS*, *NRAS* o *RHOA* se encontraban práctica o totalmente ausentes en los casos de LF sin TH, reforzando su posible papel en la patogénesis de la transformación a linfoma agresivo (Figura Suplementaria S2).

▪ **Comparación con LDCBG de novo CGB/no-CGB**

Con el objetivo de buscar diferencias o semejanzas entre el LF en el momento de la TH con el LDCBG *de novo*, se llevó a cabo la secuenciación masiva de 30 pacientes con LDCBG de nuevo diagnóstico, 15 de los cuales pertenecían al subtipo CGB y 15 al subtipo no-CGB de acuerdo al algoritmo de Hans.²⁰ De estos 30 pacientes, 25 casos fueron secuenciados mediante tecnología de amplicones con una profundidad de cobertura media de 3438x (intervalo, 104x-22777x), y 5 mediante captura con una profundidad media de 1480x (intervalo, 180x-2666x). En todos los casos con LDCBG de nuevo diagnóstico la secuenciación masiva se llevó a cabo en la biopsia del momento del diagnóstico, siendo la VAF media 42.7% (mediana, 41.4%; intervalo, 5.7%-92%).

Estos pacientes con LDCBG *de novo* clasificados en CGB y no-CGB mostraron un perfil de mutaciones clásico de cada subtipo (Figura 3A), ya que los pacientes clasificados como subtipo CGB mostraron alteraciones en genes característicos de CG como *SGK1* (50%), *EZH2* (33.3%), *GNA13* (26.7%), *TNFRSF14* (26.7%), *B2M* (20%), *EBF1* (13.3%) y *BCL6* (6.7%), y ausencia completa de genes típicos de subtipo no-CGB como *MYD88*, *TNFAIP3* o *CD79B*. Estos genes mostraron frecuencias de 6.7%, 13.3% y 20% en el subtipo no-CGB, respectivamente, además de alteraciones en otros genes clásicos, pero no exclusivos, como *PIM1* (20%), *TBLXR1* (20%) y *CDKN2A* (13.3%), presentes en baja frecuencia en el subtipo CGB (Figura 3A).²⁴⁻²⁶ El perfil mutacional descrito de los casos con LDCBG confirmó que se trataba de una serie representativa de esta patología, permitiendo llevar a cabo la comparación de ambos grupos con los 16 pacientes en el momento de la TH a linfoma agresivo.

Tal y como se ha descrito en estudios previos, los 16 pacientes con TH presentaron un perfil mutacional más cercano al LDCBG subtipo CGB que no-CGB, ya que mostraron alteraciones en genes clásicos y ausentes en el subtipo no-CGB como *SGK1* (9.9%), *B2M* (6.2%), *BCL6* (6.2%) y *GNA13* (6.2%), además de otras en genes presentes en no-CGB en frecuencias muy bajas como *EZH2* (31.2%), *TNFRSF14* (50%) o *EBF1* (12.5%). Sin embargo, se observaron 3 pacientes con alteraciones en *MYD88* (6.2%) y *CD79B* (12.5%) coincidiendo con los casos que mostraron transformación a LDCBG no-CGB, según el algoritmo de Hans. Además, se detectó un cuarto caso con este patrón inmunohistoquímico que no presentó ninguna alteración en el momento de la transformación, quizá debido a la adquisición de alteraciones diferentes no analizadas en el presente trabajo. A pesar de ello, la TH mostró un perfil característico y único, presentando una serie de alteraciones no observadas

en ninguno de los casos con LDCBG, ni tampoco reportadas en estudios previos con exoma completo en LDCBG,²⁶ como mutaciones en *GNAI2* (12.5%), *RRAGC* (12.5%), *KRAS* (12.5%), *NRAS* (12.5%), *TMEM30A* (9.1%) o *RHOA* (6.2%) (Figura 3B). Además, los pacientes con TH mostraron diferencias en determinados genes que, aunque se observaron tanto en LF con TH como en los casos con LDCBG *de novo*, mostraron una frecuencia aumentada en el este grupo de pacientes. Estos genes fueron principalmente *CREBBP*, que mostró diferencias significativas con CGB (62.5% vs. 11.8%, $P < 0.01$) y próximas a la significación en el caso de no-CGB (62.5% vs. 26.7%, $P = 0.07$), y *KMT2D* (68.8% vs. 26.7%) y *TNFRSF14* (50% vs. 6.7%), que mostraron diferencias estadísticamente significativas con no-CGB ($P < 0.05$). En el caso de *BCL2*, la frecuencia fue superior en la TH respecto a ambos subtipos de LDCBG sin llegar a la significación estadística (Figura 3B).

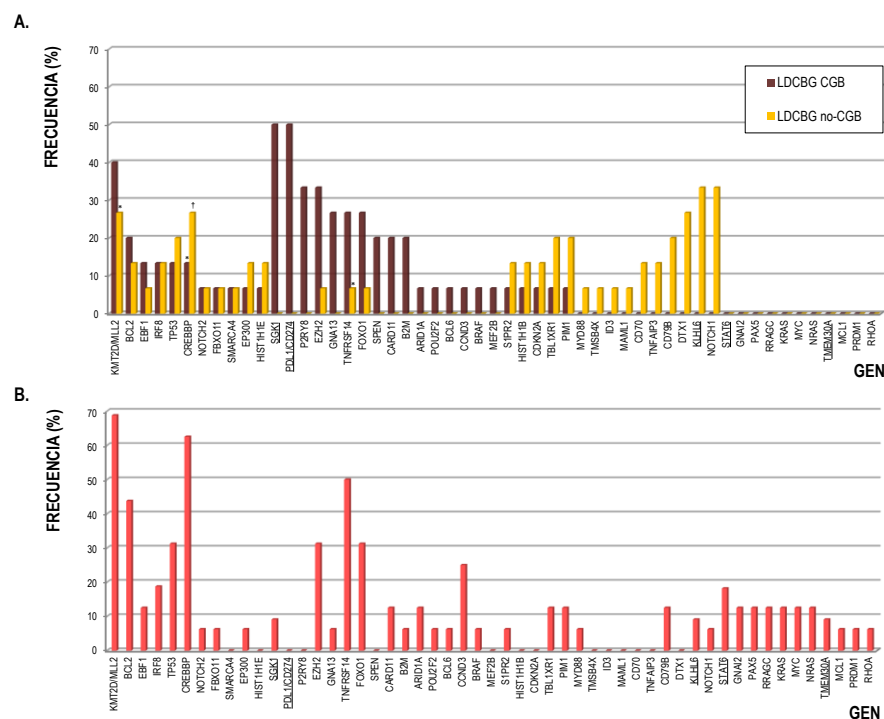


Figura 3. Perfil mutacional del (A) LDCBG dividido en subtipo CGB/no-CGB y (B) LFt en el momento de la TH a linfoma agresivo. (A) Se analizaron 30 pacientes con LDCBG clasificados mediante el algoritmo de Hans en CGB (n=15) y no-CGB (n=15), observando un perfil característico de cada uno de los subtipos. **(B)** Fueron analizadas las 16 biopsias correspondientes al momento de la TH de los 16 pacientes con LFt estudiados, observando un patrón mutacional más cercano al subtipo CGB pero con alteraciones únicas y propias del LFt. En ambos diagramas se observan a lo largo del eje X los 53 genes que presentaron alteraciones en al menos uno de los pacientes analizados, subrayados aquellos analizados sólo en los casos secuenciados mediante tecnología de captura. * $P < 0.05$ y † $P < 0.1$. CGB, subtipo centro germinal B; LDCBG, linfoma difuso de célula B grande; LFt, linfoma folicular transformado; no-CGB, subtipo no centro germinal B; TH, transformación histológica.

5. Número de mutaciones y genes mutados

Al analizar el número de genes mutados y el número de mutaciones por caso en todos los pacientes con TH, se observó un número creciente de genes mutados y de mutaciones entre los distintos episodios de la

enfermedad (Figura 4). Así, la media de genes alterados por caso fue 3.4 (intervalo, 1-6) en el momento del diagnóstico, 5.4 (intervalo, 2-8) en el momento de la recaída del LF y 6.7 genes por caso (intervalo, 2-10) en el momento de la TH a linfoma agresivo. Algo similar ocurrió con el número de mutaciones por caso, siendo la media en el momento del diagnóstico de 4.5 mutaciones por caso (intervalo, 1-9), 7.1 (intervalo, 3-11) en las recaídas del LF y 8.5 (intervalo, 3-14) en el momento de la transformación. Tanto la media de genes alterados por caso como la media de mutaciones mostraron diferencias estadísticamente significativas entre el momento del diagnóstico y la recaída del LF ($P < 0.05$), y entre el momento del diagnóstico y de la TH a linfoma agresivo ($P < 0.01$).

La media de genes alterados por caso en el momento del diagnóstico del grupo de pacientes con LF que sufren TH fue significativamente menor respecto a los pacientes sin TH (3.4 vs. 4.8, $P < 0.05$), mientras que fue similar en comparación con el LDCBG *de novo* (3.4 vs. 4.2, $P > 0.05$) (Figura Suplementaria S3). Por otro lado, la media de mutaciones por caso fue similar en los tres grupos (6 LF sin TH vs. 4.5 LF con TH vs. 5 LDCBG, $P > 0.01$). Al aumentar el número de genes alterados y mutaciones en el momento de la TH, las diferencias fueron estadísticamente significativas tanto en el número de genes alterados (6.7 vs. 4.2, $P < 0.01$) como de mutaciones por caso (8.5 vs. 5, $P < 0.01$) respecto a los pacientes con LDCBG *de novo* (Figura Suplementaria S3).

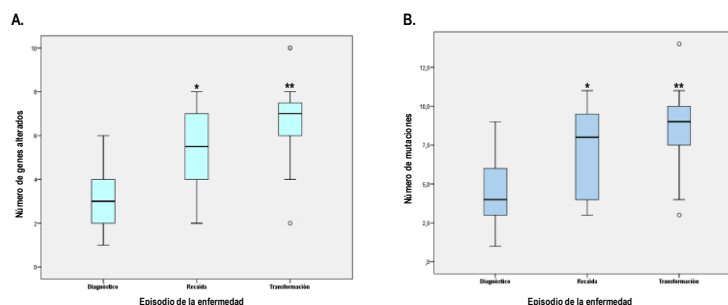


Figura 4. Número de lesiones genéticas en función del episodio de la enfermedad de los pacientes con LF transformado (n=16). Diagramas *boxplot* que muestran la tendencia creciente tanto del (A) número de genes alterados, como del (B) número de mutaciones, agrupados en función del episodio de la enfermedad estudiado. La línea horizontal representa la mediana para cada episodio, y las diferencias estadísticamente significativas respecto al momento del diagnóstico son representadas mediante * para $P < 0.05$ y ** para $P < 0.01$.

6. Impacto de las variables clínico-biológicas en el tiempo hasta la TH

Considerando todos los pacientes que sufrieron TH (n=16) clonalmente relacionada, 5 de ellos (31.2%) se habían transformado antes de los 5 años de seguimiento, mientras que 8 (50%) lo hicieron entre los 5 y 10 años desde la fecha del diagnóstico. Con el objetivo de determinar algún marcador en el momento del diagnóstico que ayude a identificar el grupo de pacientes que sufrirá TH precoz (<5 años desde el diagnóstico), se analizó el

impacto de las distintas variables clínico-biológicas en el tiempo hasta la transformación (TTT, por sus siglas en inglés). En el análisis se incluyeron las alteraciones en genes presentes en al menos 3 casos en el momento del diagnóstico: *CREBBP*, *KMT2D*, *BCL2*, *TNFRSF14*, *FOXO1* y *EZH2*.

Se observaron diferencias al analizar el impacto del gen *FOXO1* en el TTT de forma que los pacientes con TH que mostraron alteraciones en *FOXO1* en la biopsia del diagnóstico presentaron una mediana de TTT más corta que el resto (1.7 vs. 7.6 años, $P = 0.06$). Estas diferencias fueron estadísticamente significativas en el análisis de supervivencia mediante *Kaplan-Meier*, ya que antes de alcanzar los 5 años de seguimiento, el 66.7% de los pacientes con alteraciones en *FOXO1* habían sufrido TH respecto al 18.2% de los pacientes sin este gen alterado ($P < 0.01$) (Figura 5A). No se observaron diferencias significativas en otros genes, si bien no fue posible extraer conclusiones definitivas al ser la serie relativamente corta.

Al analizar el impacto de las variables clínicas en este mismo contexto, se observó cómo los pacientes clasificados en el grupo de alto riesgo según el índice pronóstico FLIPI en el momento del diagnóstico, mostraron una mediana de TTT significativamente inferior a aquellos clasificados en el grupo de riesgo bajo o intermedio (2.5 vs. 7.6 años, $P < 0.05$), manteniendo su significación en el análisis de *Kaplan-Meier* de la misma forma que en el caso anterior (75% vs. 20%, $P < 0.05$) (Figura 5B). El resto de variables clínicas no mostraron asociación con TTT en este grupo de pacientes.

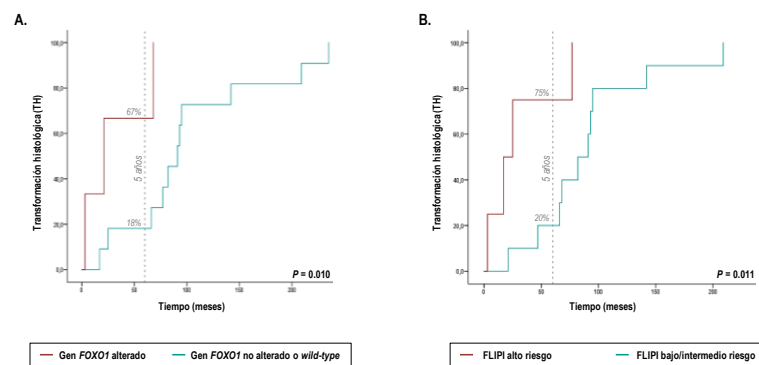


Figura 5. Análisis *Kaplan-Meier* del tiempo hasta la transformación histológica (TTT) en función (A) de la presencia o ausencia de alteraciones en el gen *FOXO1*, y (B) del grupo de riesgo asignado según el índice pronóstico FLIPI, ambos evaluados en el momento del diagnóstico. Los pacientes con (A) alteraciones en el gen *FOXO1* o (B) FLIPI de alto riesgo, se representan con una línea granate, mientras que aquellos (A) sin alteraciones en *FOXO1* o (B) FLIPI de bajo/intermedio riesgo, son representados mediante una línea azul. La línea vertical discontinua indica 5 años de seguimiento.

El análisis multivariante mostró una asociación significativa e independiente de las alteraciones en el gen *FOXO1* (HR: 21.20, IC 95%: 1.96-229.20) y FLIPI de alto riesgo (HR: 18.73, IC 95%: 2.00-174.92) en el momento del diagnóstico con menor TTT (Tabla 2). Estos resultados hay que confirmarlos en una serie mayor.

Tabla 2. Resultados del análisis univariante y multivariante de los factores implicados en el tiempo hasta la transformación histológica (TTT).

Variable	TH (%) a 5 años	U (P-valor)	M (P-valor)	HR [IC 95%]
FLIPI				
Bajo/Intermedio (referencia)	80.0%	0.011	-	-
Alto	25.0%		0.010	18.73 [2.00-174.92]
FOXO1 alterado (si)	33.3%	0.010	0.012	21.20 [1.96-229.20]

FLIPI, índice pronóstico internacional para el linfoma folicular (LF); HR, hazard ratio; IC, intervalo de confianza; M, análisis multivariante; TH, transformación histológica; U, análisis univariante.

7. Modelos de evolución clonal

En base a los resultados de mutaciones puntuales y/o *indels* en la región codificante de los 66 genes analizados, se planteó evaluar el patrón de evolución que sigue el clon tumoral durante el transcurso de la enfermedad. Para ello, se estudió en detalle la ganancia y pérdida de alteraciones entre los distintos episodios de la enfermedad en 14 pacientes de los 16 con TH incluidos en el presente capítulo. Los dos casos restantes fueron excluidos debido a que no presentaron biopsia en el momento del diagnóstico.

En todos los casos, la relación clonal detectada mediante el estudio del reordenamiento V(D)J (BIOMED-2) o *breakpoint* de la t(14;18) fue confirmada por la presencia de alteraciones genéticas compartidas entre los distintos episodios de la enfermedad. En todos los pacientes se observaron alteraciones en la biopsia de la recaída y/o transformación completamente ausentes en el momento del diagnóstico, descartando la posibilidad de un modelo de evolución estable en el LF a diferencia de lo que ocurre en otras enfermedades como el mieloma múltiple (MM).²⁷ Por tanto, en concordancia con lo previamente publicado en esta patología, la presencia de alteraciones compartidas y aquellas específicas de fase permitió establecer dos modelos: evolución clonal lineal o secuencial, en el que cada episodio muestra las alteraciones adquiridas en el episodio anterior, y evolución clonal divergente o ramificada, en el que se observa adquisición de alteraciones diferentes y propias de cada episodio de la enfermedad, cada uno de ellos con posibles variantes. Sin embargo, e independientemente del modelo, en todos los casos la evolución del clon tumoral tuvo lugar a partir de un CPC con alteraciones en los genes *CREBBP* y/o *KMT2D*, reforzando la hipótesis que establece como segundo *hit* en la patogénesis del LF la alteración de la categoría funcional *modificación epigenética*.

- **Modelo de evolución lineal o secuencial** (Figura 6), aquel en el que el clon responsable de la transformación a linfoma agresivo mantiene todas las alteraciones observadas en los clones dominantes del diagnóstico y de las recaídas del linfoma indolente, si las hubiera, además de alteraciones adquiridas en el proceso de TH. Es decir, en cada episodio de la enfermedad analizado se

observan todas las alteraciones del episodio anterior, además de las características adquiridas en la etapa correspondiente. Este patrón de evolución se observó en 7 casos de los 14 analizados (50%), dos de ellos incluyendo recaída intermedia del LF, y todos tratados durante su etapa indolente con CHOP (3/7 casos, 42.9%) o R-CHOP (4/7 casos, 57.1%) (Figuras 6A y 7A).

- **Modelo de evolución divergente o ramificada** (Figura 6), aquellos casos en los que el clon dominante de cada uno de los episodios de la enfermedad presenta lesiones genéticas diferentes y únicas, aparte de alteraciones compartidas que manifiestan la relación clonal entre los distintos episodios. Se clasificaron 7 casos de los 14 (50%) en este modelo de evolución clonal. Tres de estos pacientes no habían recibido tratamiento en su etapa indolente, mientras que, de los otros cuatro, dos habían recibido QT sin rituximab y dos R-IQT. En 4 de estos 7 casos con evolución divergente, el CPC estaba poco mutado ya que presentó entre 2 y 3 alteraciones, mientras que en los tres restantes presentó de 5 a 7 alteraciones.

Dentro del patrón divergente se pueden distinguir tres subtipos o variantes en función de cómo tenga lugar la emergencia de los clones dominantes responsables de los distintos episodios de la enfermedad. Así, se observaron casos en que los clones responsables tanto del LF como de la TH divergen del CPC y, en aquellos que presentaron recaída de su linfoma indolente, el clon responsable surgió a partir del clon del diagnóstico (3/7 casos, Figuras 6B y 7B). En un caso se observó una variante en la que el clon responsable de la recaída del LF emerge del clon de la TH (Figuras 6C y 7C), a diferencia de lo descrito previamente, ya que en este momento no se observó ninguna de las alteraciones específicas de la biopsia del diagnóstico. En este caso, debido al corto periodo de tiempo transcurrido entre los distintos episodios de la enfermedad, se plantea la posibilidad de que coexistan dos poblaciones tumorales en la biopsia de la TH, siendo una de ellas la responsable de la recaída tras la adquisición de alteraciones no analizadas en el presente capítulo. Por último, se pueden observar casos en los que el CPC, sin adquirir ninguna alteración en las regiones analizadas, da lugar al LF del que surgen tanto el clon de la recaída del LF, como el clon responsable de la transformación (3/7 casos, Figuras 6D y 7D). Un caso interesante dentro del último subtipo o variante fue el del paciente P11, quien mostró las mismas alteraciones en *BCL2*, *CREBBP* y *KMT2D* en todos los episodios analizados. Adquirió dos mutaciones en el gen *TP53* (p.Gly187Val, proteína parcialmente funcional; p.Leu111Arg, proteína no funcional), y una en *POU2F2* en el momento de la recaída del LF. En la biopsia de la TH, sólo se observó la mutación p.Leu111Arg de *TP53*, además de la adquisición de una mutación en *CCND3*. Al analizar en profundidad la histología de la recaída del LF se observó la coexistencia de dos poblaciones de bajo grado en la misma biopsia, una más indolente con grado 2 que presentaría la mutación en *TP53* que da

lugar a la proteína parcialmente funcional (p.Gly187Val) y *POU2F2* alterado, y otra más agresiva con grado 3A que portaría la mutación de pérdida de función en *TP53* (p.Leu111Arg) y que sería la responsable de la TH junto a la alteración en *CCND3* adquirida en este episodio (Figura Suplementaria S4).

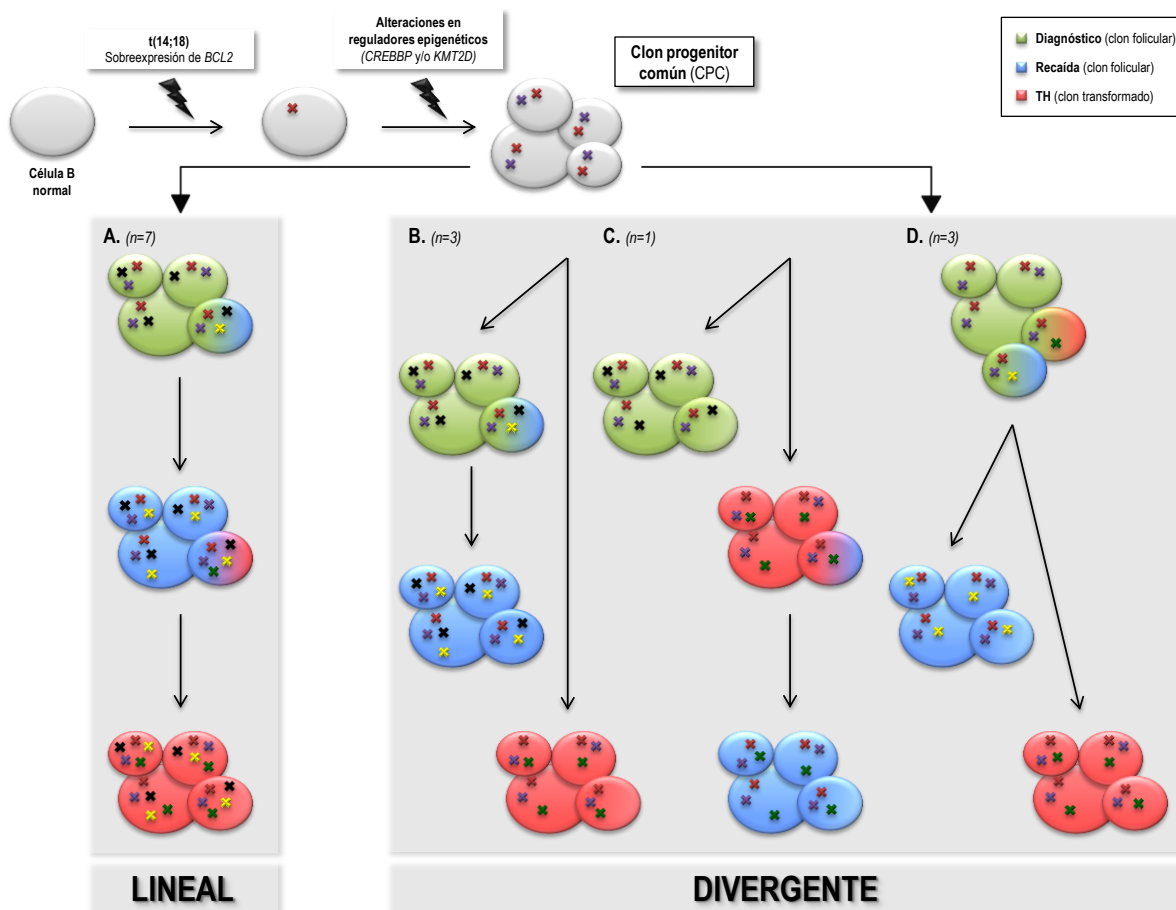


Figura 6. Representación de los modelos de evolución clonal descritos para los pacientes con Lft analizados (n=14). Se define modelo de **evolución clonal lineal o secuencial** (n=7), aquel en que cada episodio de la enfermedad muestra todas las alteraciones del episodio anterior, además de las características adquiridas en la etapa correspondiente; y modelo de **evolución clonal divergente o ramificado** (n=7), aquel en que el clon dominante de cada episodio de la enfermedad presenta lesiones genéticas diferentes y características, además de alteraciones compartidas que reflejan la relación clonal. Las cruces de colores representan alteraciones adquiridas y/o mantenidas en cada episodio de la enfermedad. TH, transformación histológica.

Al comparar las frecuencias en que se detectaron alterados los distintos genes analizados, se observó una menor frecuencia en el modelo lineal respecto al modelo divergente de los genes *CREBBP* (28.6% vs. 85.7%), *TNFRSF14* (28.6% vs. 71.4%) y *EZH2* (14.3% vs. 42.9%), si bien las diferencias no fueron estadísticamente significativas debido al bajo número de casos analizado.

Del mismo modo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las características clínicas de los pacientes según el modelo en el que fueron clasificados. Tampoco se observó una asociación

entre la estrategia terapéutica aplicada durante la etapa indolente y el tipo de patrón de evolución clonal, por lo que se pone en duda una posible presión selectiva por parte del tratamiento en estos casos.

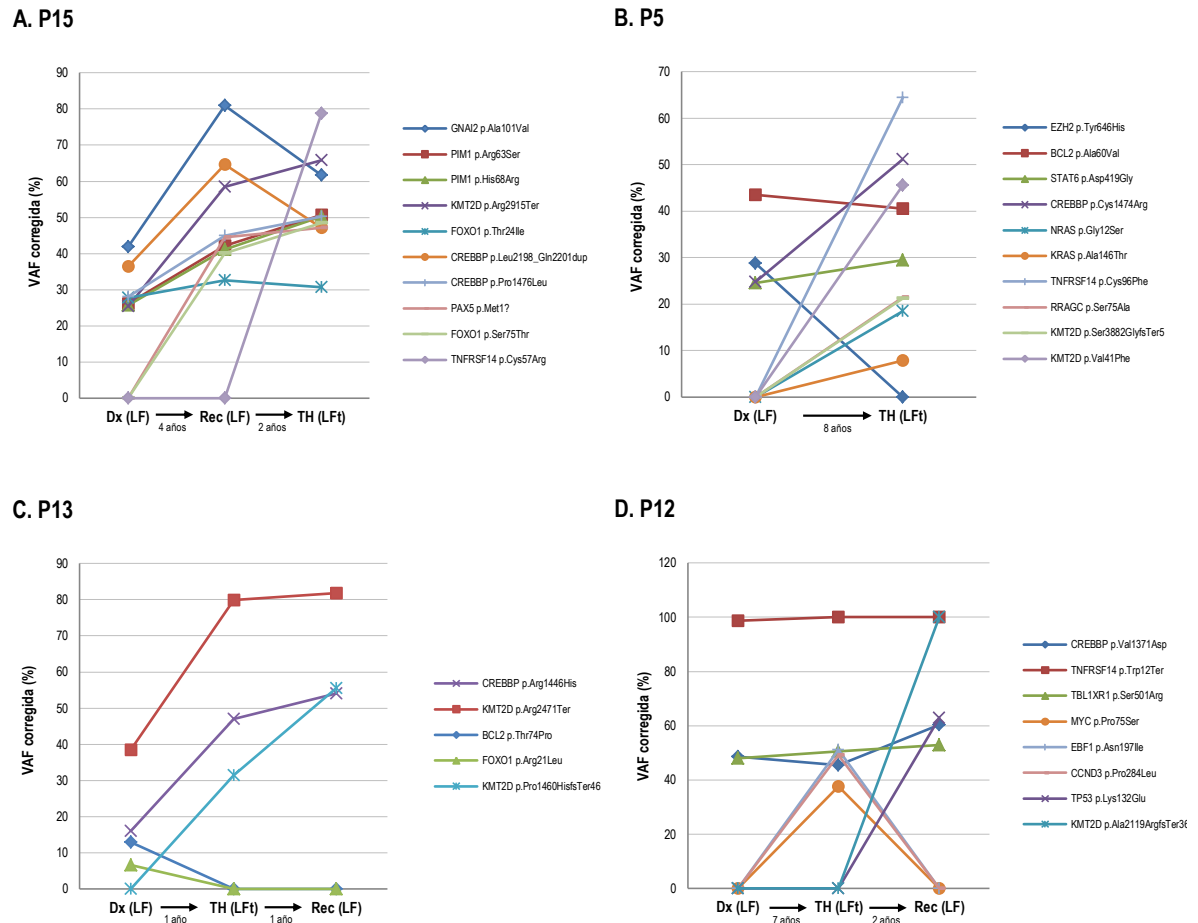


Figura 7. Diagramas lineales que ilustran el patrón de evolución del clon tumoral responsable de la enfermedad correspondiente al modelo lineal en el caso (A) P15, y al modelo divergente en los casos (B) P5, (C) P13 y (D) P12. Cada una de las líneas representa una alteración concreta en un gen concreto. En el eje X se indican los episodios de la enfermedad en que se detectan las alteraciones y en el eje Y, la frecuencia de la variante alterada (VAF) corregida según la infiltración de la biopsia analizada. Las flechas indican el tiempo transcurrido entre cada episodio analizado. Dx, diagnóstico; LF, linfoma folicular; LFT, linfoma folicular transformado; Rec, recaída; TH, transformación histológica; VAF, frecuencia de la variante alterada.

DISCUSIÓN

La TH es un proceso relativamente frecuente en el LF (25-30%) y, cuando sucede, supone uno de los eventos de peor pronóstico para los pacientes con LF.^{7;8;28} Desentrañar la biología de este proceso permitiría definir biomarcadores en el momento del diagnóstico que identifiquen los pacientes que sufrirán TH y desarrollar estrategias terapéuticas dirigidas al control de la enfermedad. Con este objetivo, se planteó estudiar del perfil genético en los distintos episodios de la enfermedad de los pacientes con LF que habían experimentado TH en nuestro centro (n=16), incorporando el análisis de recaídas intermedias del linfoma indolente junto con las biopsias pareadas correspondientes al momento del diagnóstico y TH. Los resultados del estudio muestran un perfil de alteraciones característico del LF con TH y diferente al LDCBG *de novo*, con la adquisición de alteraciones específicas, algunas de ellas no descritas previamente. Además, se establecieron dos modelos mayoritarios de evolución clonal, sin observarse diferencias biológicas o clínicas significativas entre ellos. En conjunto, los resultados reflejan una mayor variabilidad y complejidad del proceso de TH, incluso teniendo en cuenta únicamente mutaciones puntuales en un grupo seleccionado de genes.

En concordancia con lo descrito acerca de la progresión y transformación del LF, se observó un incremento significativo tanto en número de genes alterados como en número de mutaciones por caso al comparar las biopsias correspondientes al diagnóstico con los episodios sucesivos de la enfermedad.^{9;11;12;29} En comparación con el LF sin TH o con el LDCBG *de novo*, los pacientes con TH en el momento del diagnóstico presentaron menor número de genes alterados y un número similar de mutaciones. Sin embargo, al adquirir mutaciones en el momento de la TH tanto el número de genes alterados como de mutaciones aumentó respecto al LDCBG *de novo*. Este hallazgo podría deberse a la utilización de un panel de secuenciación masiva dirigida, ya que no permite visualizar el panorama genético en su totalidad, pudiendo obviar alteraciones poco frecuentes en el LF sin TH y LDCBG que podrían estar presentes en los casos de LF que experimentarán TH.

El perfil mutacional de la TH en su conjunto presenta características semejantes al LDCBG subtipo CGB pero, tal y como se ha mostrado en estudios previos,¹¹ presentó algunas alteraciones características del no-CGB y otras exclusivas de la TH, incluyendo una mayor frecuencia de alteraciones en *CREBBP*, *KMT2D* y *BCL2* que refleja su origen en el LF. El patrón de distribución de alteraciones parece diferir entre los LF con TH en función de la célula de origen, ya que los 3 casos no-CGB presentaron alteraciones propias del LDCBG no-CGB, de acuerdo a lo previamente publicado.¹²

La comparación de mutaciones entre distintos episodios del LF ha permitido comprobar la presencia de una serie de mutaciones comunes a todos los momentos, principalmente *CREBBP* y *KMT2D*, indicando la adquisición de estas alteraciones en etapas tempranas de la patogenia del LF o en el CPC. Entre las mutaciones

adquiridas, cabe destacar la alteración del ciclo celular en la mayoría de casos con TH. De los genes de ciclo celular adquiridos, únicamente *TP53* se identificó en recaídas previas como LF pero no al diagnóstico, mostrando un papel relevante en la progresión tumoral tal y como ya se sabía,¹⁵ dando lugar a una mayor agresividad tumoral y siendo por tanto un evento que condiciona la transformación, de acuerdo a observaciones previas que indican su característica desregulación durante la transformación.^{11;14;16} El gen adquirido durante la TH más frecuente fue *CCND3*, descrito recientemente por Kridel *et al.*⁹ También se identificó por primera vez en TH la alteración de *KRAS*, *NRAS* y *RHOA*, ausentes tanto en LF sin TH como en LDCBG *de novo*. Estos genes codifican proteínas pertenecientes a familias homólogas y han sido asociados en múltiples ocasiones con transformación maligna, invasión tumoral y metástasis principalmente en tumores sólidos, pero también en linfomas B, como linfoma de Burkitt y LDCBG, linfomas y leucemias de origen T y leucemia mieloide aguda, confiriendo mal pronóstico a estos pacientes.³⁰⁻³⁴ Las alteraciones de *TNFRSF14*, presentes al diagnóstico, se adquieren en un porcentaje elevado de casos en la TH, por lo que este gen parece mostrar un papel en el proceso de transformación, de acuerdo con lo descrito previamente.^{11;15;16;35} La adquisición de alteraciones en todos estos genes podría explicar el carácter invasivo y agresivo de la TH como hecho diferencial de su contrapartida indolente y del LDCBG *de novo*.

La comparación con el LF sin TH permitió identificar mayor incidencia de alteraciones en *BCL2* y menor sin embargo en *STAT6* y *CARD11* en las muestras al diagnóstico de los casos con TH, aunque el reducido número de casos impidió alcanzar diferencias estadísticamente significativas. De confirmarse estos datos en series más grandes, podrían ser útiles en la construcción de un modelo genético para predecir la transformación.

Ninguno de los genes analizados mostró asociación significativa con supervivencia global en esta serie. Sin embargo, la presencia del gen *FOXO1* alterado, que presentó una frecuencia similar entre las distintas fases de la enfermedad, mostró asociación significativa con TH precoz, independientemente del índice pronóstico FLIPI y, por tanto, menor tiempo hasta la TH (TTT). Este resultado concuerda con un peor pronóstico asociado a este gen tal y como se vio en el capítulo 2 de la presente tesis doctoral, y la asociación descrita previamente entre lesiones en este gen y enfermedad refractaria o en recaída, principalmente en pacientes con LDCBG *de novo*.^{36;37}

Por todo lo descrito, parece lógico pensar que existe una cooperación entre alteraciones adquiridas en etapas tempranas de la patogénesis del LF y aquellas adquiridas en etapas sucesivas, dando lugar a los clones responsables de cada uno de los episodios de la enfermedad. En base a ello, se establecieron dos posibles patrones de evolución clonal: lineal o secuencial (50%) y divergente o ramificado (50%). En contra de lo descrito,^{9;14} y a pesar de la heterogeneidad en cuanto a la estrategia terapéutica aplicada, no se observó una presión selectiva que determinara la evolución del clon tumoral, ya que dentro de cada uno de los modelos de

evolución establecidos fueron clasificados pacientes sin tratamiento, pacientes tratados con quimioterapia sin rituximab y pacientes que recibieron esquemas inmunoquimioterápicos asociados a rituximab. Además, no se observaron diferencias significativas en la distribución de alteraciones genéticas y características clínicas entre los dos modelos. No obstante, estos modelos ya se han descrito en el LF,^{9,11;16;18} pero también en otras neoplasias como mieloma múltiple,²⁷ leucemia linfática crónica,³⁸ macroglobulinemia de Waldenström,³⁹ leucemia mieloide aguda,⁴⁰ y tumores sólidos.⁴¹ En la mayoría de los casos el modelo más ampliamente observado es el divergente o ramificado a diferencia de lo descrito en la presente serie. Es posible que el uso de secuenciación dirigida en lugar de secuenciación del exoma completo, o la ausencia del análisis de reordenamientos estructurales y deleciones de mayor tamaño, suponga una limitación ya que la pérdida de información podría dar lugar a inferir o sobreestimar la presencia de un patrón de evolución lineal. Por otra parte, la inclusión de biopsias procedentes de la recaída del LF ha permitido reclasificar casos en el modelo divergente, como ocurriría por ejemplo en el paciente P12 del estudio.

El estudio de muestras secuenciales, incluyendo recaídas intermedias del LF, permitió detectar variantes dentro de cada uno de los modelos y establecer, tanto en el modelo lineal como en el divergente, la presencia de un CPC con alteraciones en *CREBBP* y/o *KMT2D*. Además, la presencia de recaídas del linfoma indolente así como la TH en aquellos pacientes con evolución divergente a partir del CPC tras varias líneas de tratamiento y/o varios años desde su diagnóstico (P2, 20 años; P12, 9 años; P5 y P16, 8 años), demuestran la vida prolongada de este CPC y aporta una posible explicación de la naturaleza indolente característica de esta enfermedad.⁴²

En conclusión, aunque no se identificó un marcador o evento genético único responsable de la TH del LF a linfoma agresivo, se detectaron alteraciones concretas y específicas de fase que parecen mostrar un papel en la patogénesis de este proceso. Además, se establecieron dos posibles modelos de evolución clonal, lineal y divergente, a partir de un CPC. En conjunto, estos resultados ponen de manifiesto la complejidad genética característica de la patogénesis del LF y su TH a linfoma agresivo, que podría suponer la existencia de diferentes mecanismos que desencadenen la evolución del clon tumoral responsable de la enfermedad.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ghielmini M, Montoto S. Lymphomas. Essentials for Clinicians.; 2016.
2. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Revised 4th Edition.: IARC Press; 2017.
3. Montoto S, Davies AJ, Matthews J et al. Risk and clinical implications of transformation of follicular lymphoma to diffuse large B-cell lymphoma. *J.Clin.Oncol.* 2007;25:2426-2433.
4. Al-Tourah AJ, Gill KK, Chhanabhai M et al. Population-based analysis of incidence and outcome of transformed non-Hodgkin's lymphoma. *J.Clin.Oncol.* 2008;26:5165-5169.
5. Conconi A, Ponzio C, Lobetti-Bodoni C et al. Incidence, risk factors and outcome of histological transformation in follicular lymphoma. *Br.J.Haematol.* 2012;157:188-196.
6. Minoia C, Zucca E, Conconi A. Novel acquisitions on biology and management of transformed follicular lymphoma. *Hematol.Oncol.* 2018;36:617-623.
7. Alonso-Alvarez S, Magnano L, Alcoceba M et al. Risk of, and survival following, histological transformation in follicular lymphoma in the rituximab era. A retrospective multicentre study by the Spanish GELTAMO group. *Br.J.Haematol.* 2017;178:699-708.
8. Alcoceba, M., Alonso-Alvarez, S., García-Álvarez, M, Martín, A, and Caballero, M. D. Unmet needs in histological transformation of follicular lymphoma: a clinical and biological review. *Ann.Lymphoma* 1. 21-11-2017.
9. Kridel R, Chan FC, Mottok A et al. Histological Transformation and Progression in Follicular Lymphoma: A Clonal Evolution Study. *PLoS.Med.* 2016;13:e1002197.
10. Federico M, Caballero B, Marcheselli L et al. Rituximab and the risk of transformation of follicular lymphoma: a retrospective pooled analysis. *Lancet Haematol.* 2018;5:e359-e367.
11. Pasqualucci L, Khiabanian H, Fangazio M et al. Genetics of follicular lymphoma transformation. *Cell Rep.* 2014;6:130-140.
12. Kridel R, Mottok A, Farinha P et al. Cell of origin of transformed follicular lymphoma. *Blood* 2015;126:2118-2127.
13. Kridel R, Sehn LH, Gascoyne RD. Can histologic transformation of follicular lymphoma be predicted and prevented? *Blood* 2017;130:258-266.
14. Okosun J, Montoto S, Fitzgibbon J. The routes for transformation of follicular lymphoma. *Curr.Opin.Hematol.* 2016;23:385-391.
15. Lossos IS, Gascoyne RD. Transformation of follicular lymphoma. *Best.Pract.Res.Clin.Haematol.* 2011;24:147-163.
16. Okosun J, Bodor C, Wang J et al. Integrated genomic analysis identifies recurrent mutations and evolution patterns driving the initiation and progression of follicular lymphoma. *Nat.Genet.* 2014;46:176-181.
17. Correia C, Schneider PA, Dai H et al. BCL2 mutations are associated with increased risk of transformation and shortened survival in follicular lymphoma. *Blood* 2015;125:658-667.
18. Gonzalez-Rincon J, Mendez M, Gomez S et al. Unraveling transformation of follicular lymphoma to diffuse large B-cell lymphoma. *PLoS.One.* 2019;14:e0212813.
19. Lynch RC, Gratzinger D, Advani RH. Clinical Impact of the 2016 Update to the WHO Lymphoma Classification. *Curr.Treat.Options.Oncol.* 2017;18:45.
20. 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.
21. Kupperts R, Stevenson FK. Critical influences on the pathogenesis of follicular lymphoma. *Blood* 2018;131:2297-2306.
22. Krysiak K, Gomez F, White BS et al. Recurrent somatic mutations affecting B-cell receptor signaling pathway genes in follicular lymphoma. *Blood* 2017;129:473-483.

23. Pastore A, Jurinovic V, Kridel R et al. Integration of gene mutations in risk prognostication for patients receiving first-line immunochemotherapy for follicular lymphoma: a retrospective analysis of a prospective clinical trial and validation in a population-based registry. *Lancet Oncol.* 2015;16:1111-1122.
24. Compagno M, Lim WK, Grunn A et al. Mutations of multiple genes cause deregulation of NF-kappaB in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature* 2009;459:717-721.
25. Morin RD, Johnson NA, Severson TM et al. Somatic mutations altering EZH2 (Tyr641) in follicular and diffuse large B-cell lymphomas of germinal-center origin. *Nat.Genet.* 2010;42:181-185.
26. Reddy A, Zhang J, Davis NS et al. Genetic and Functional Drivers of Diffuse Large B Cell Lymphoma. *Cell* 2017;171:481-494.
27. Bianchi G, Ghobrial IM. Biological and Clinical Implications of Clonal Heterogeneity and Clonal Evolution in Multiple Myeloma. *Curr.Cancer Ther.Rev.* 2014;10:70-79.
28. Wagner-Johnston ND, Link BK, Byrtek M et al. Outcomes of transformed follicular lymphoma in the modern era: a report from the National LymphoCare Study (NLCS). *Blood* 2015;126:851-857.
29. Kridel R, Sehn LH, Gascoyne RD. Pathogenesis of follicular lymphoma. *J.Clin.Invest* 2012;122:3424-3431.
30. Zhou JD, Yao DM, Li XX et al. KRAS overexpression independent of RAS mutations confers an adverse prognosis in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Oncotarget.* 2017;8:66087-66097.
31. Greil R, Pleyer L, Jansko B et al. Sequential immunotherapy in a patient with primary refractory Hodgkin lymphoma and novel mutations. *Oncotarget.* 2018;9:20928-20940.
32. Choi SM, Andea AA, Wang M et al. KRAS mutation in secondary malignant histiocytosis arising from low grade follicular lymphoma. *Diagn.Pathol.* 2018;13:78.
33. Liu X, Ye Q, Zhao XP et al. RAS mutations in acute myeloid leukaemia patients: A review and meta-analysis. *Clin.Chim.Acta* 2019;489:254-260.
34. Kataoka K, Ogawa S. Variegated RHOA mutations in human cancers. *Exp.Hematol.* 2016;44:1123-1129.
35. Cheung KJ, Johnson NA, Affleck JG et al. Acquired TNFRSF14 mutations in follicular lymphoma are associated with worse prognosis. *Cancer Res.* 2010;70:9166-9174.
36. Morin RD, Assouline S, Alcaide M et al. Genetic Landscapes of Relapsed and Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphomas. *Clin.Cancer Res.* 2016;22:2290-2300.
37. Trinh DL, Scott DW, Morin RD et al. Analysis of FOXO1 mutations in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2013;121:3666-3674.
38. Gonzalez-Rincon J, Gomez S, Martinez N et al. Clonal dynamics monitoring during clinical evolution in chronic lymphocytic leukaemia. *Sci.Rep.* 2019;9:975.
39. Jimenez C,onso-Alvarez S, Alcoceba M et al. From Waldenstrom's macroglobulinemia to aggressive diffuse large B-cell lymphoma: a whole-exome analysis of abnormalities leading to transformation. *Blood Cancer J.* 2017;7:e591.
40. Ding L, Ley TJ, Larson DE et al. Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukaemia revealed by whole-genome sequencing. *Nature* 2012;481:506-510.
41. Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N.Engl.J.Med.* 2012;366:883-892.
42. Carlotti E, Wrench D, Matthews J et al. Transformation of follicular lymphoma to diffuse large B-cell lymphoma may occur by divergent evolution from a common progenitor cell or by direct evolution from the follicular lymphoma clone. *Blood* 2009;113:3553-3557.

MATERIAL SUPLEMENTARIO - Figuras Suplementarias:

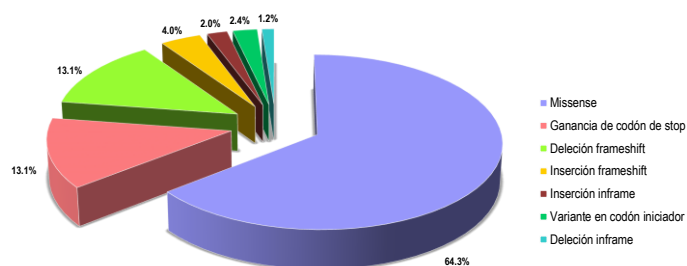


Figura Suplementaria S1. Diagrama circular que representa la clasificación de las 252 variantes somáticas identificadas en los 16 pacientes con LfT analizados.

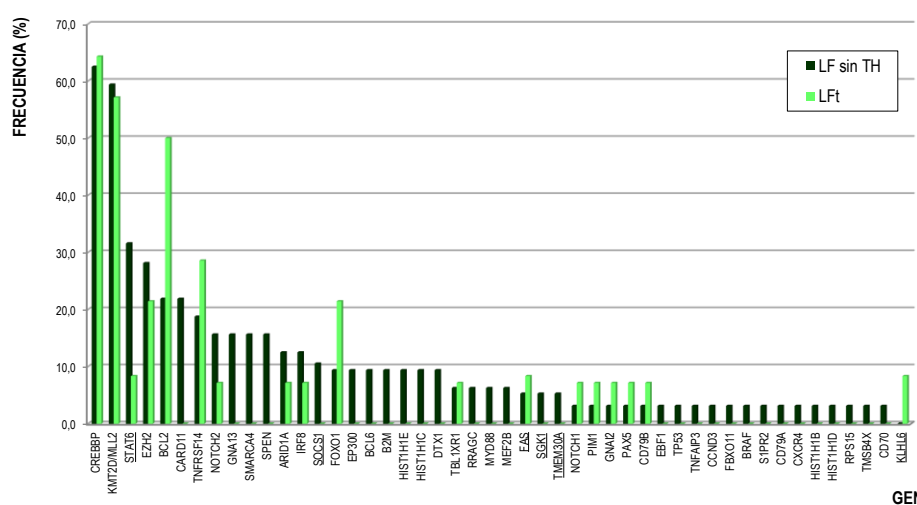


Figura Suplementaria S2. Distribución de los genes alterados en el LF sin TH a 5 años (n=32) en comparación con el LFt (n=13) en el momento del diagnóstico. A lo largo del eje X del gráfico de barras se representan los 48 genes alterados en al menos en uno de los pacientes analizados, subrayados aquellos analizados sólo en los casos secuenciados mediante tecnología de captura.

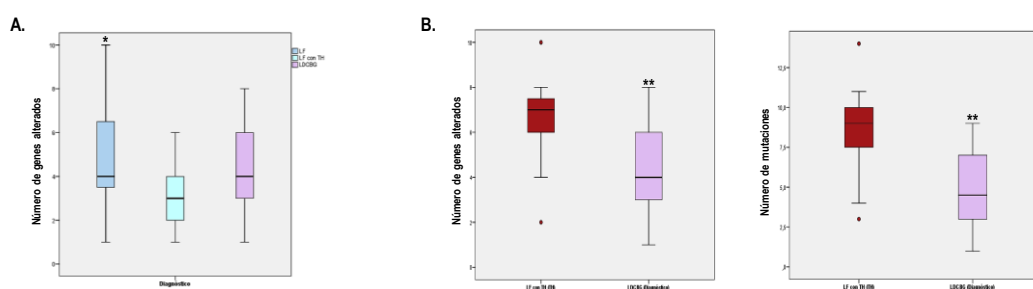


Figura Suplementaria S3. Diagramas *boxplot* que reflejan las diferencias entre (A) el número de genes alterados en el momento del diagnóstico entre el LF sin TH, el LF con TH y el LDCBG *de novo*, y (B) el número de genes alterados y mutaciones entre los grupos con histología agresiva, es decir, entre el LF con TH en el momento de la TH y el LDCBG *de novo* al diagnóstico. La línea horizontal representa la mediana, y las diferencias estadísticamente significativas respecto al LF con TH son representadas mediante * para $P < 0.05$ y ** para $P < 0.01$.

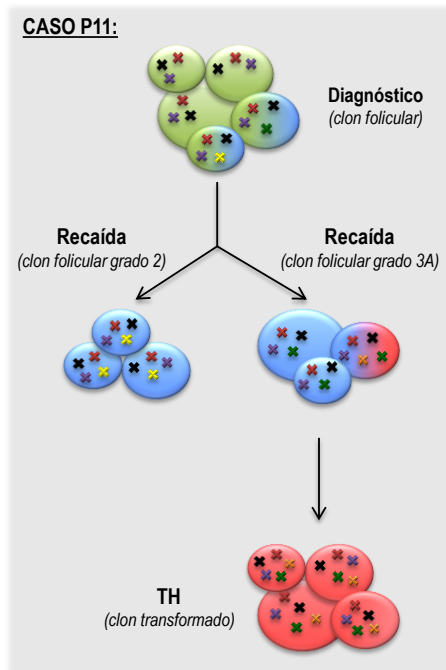


Figura Suplementaria S4. Representación del modelo de evolución clonal divergente correspondiente al caso P11. Las cruces de colores representan alteraciones adquiridas y/o mantenidas en cada episodio de la enfermedad. TH, transformación histológica.

DISCUSIÓN GENERAL

El linfoma folicular (LF) es el linfoma indolente más frecuente y el segundo de todos los linfomas no Hodgkin (LNH) en Europa Occidental y América. Como se ha comentado en epígrafes previos, se trata de una enfermedad compleja y heterogénea con un curso clínico característico dominado por múltiples recaídas, refractariedad a las terapias convencionales e, incluso, transformación histológica (TH) a linfoma con histología agresiva, principalmente linfoma difuso de célula B grande (LDCBG). Esta complejidad clínica representativa del LF también se observa en su patobiología, siendo la principal causa por la que los mecanismos biológicos responsables de su desarrollo y TH continúen siendo una cuestión sin resolver en nuestros tiempos. Por consiguiente, los tres trabajos comprendidos en la presente tesis doctoral tienen como objetivo desentrañar la biología del LF desde etapas iniciales en la médula ósea (MO) hasta etapas más avanzadas como su TH, analizando los genes y lesiones genéticas involucradas en estos procesos. Esto permitió detectar biomarcadores que identifican pacientes con peor curso clínico de la enfermedad y los diferencian de aquellos que requieren terapias menos agresivas.

El **primer trabajo** se centra en el estudio de la biología del LF desde el reordenamiento de los genes V(D)J de la cadena pesada de las Igs que tiene lugar en la MO. El estudio se realizó en la serie de pacientes con LF más grande descrita hasta la fecha, donde además se evaluó por primera vez el papel de los genes IGHV en el proceso de TH. Este análisis permitió detectar un sesgo en la frecuencia de uso de los genes IGHV que caracteriza al LF y diferencia esta patología del resto de neoplasias de célula B madura. El uso o expresión sesgada de determinados genes lleva a pensar en la implicación de determinados antígenos en el desarrollo del LF, que podrían desencadenar la proliferación de células B con expresión de Igs de superficie codificadas a partir de genes específicos. Además, el análisis comparativo permitió detectar genes expresados en el LF completamente ausentes en uno o ambos tipos de LDCBG (*IGHV4-34*, *IGHV3-30*),¹ hallazgo que podría resultar útil en el diagnóstico diferencial entre ambas patologías, ya que permitiría distinguir entre un LDCBG derivado de la TH de un LF y un LDCBG *de novo*. A pesar de que no se observó un impacto relevante en la clínica de los pacientes con LF, el uso de genes IGHV mostró un papel importante en el desarrollo de esta patología y gran relevancia en la transformación a linfoma agresivo, ámbito en el que se describió el hallazgo más novedoso de este primer trabajo, si bien debe ser validado en series independientes. Así, se descubrió el papel del gen *IGHV3-48* en la patogénesis de la transformación, ya que se asoció significativamente con mayor riesgo de TH a 10 años en estos pacientes, independientemente del tipo de terapia recibida. Estos resultados ponen de manifiesto la relevancia de estudiar los genes IGHV en el momento del diagnóstico, ya que podría resultar útil para predecir la TH de los pacientes con LF y su supervivencia, además de ser útil en el diagnóstico diferencial entre distintas patologías de célula B. Adicionalmente, el análisis del reordenamiento V(D)J, o únicamente de los genes IGHV, resulta importante a la hora de definir un paciente con LF transformado (LFt), ya que es básico para

confirmar la relación clonal entre el linfoma indolente y el linfoma agresivo consecuente de la TH. La ausencia de su estudio podría dar lugar a error, ya que el 4% de los casos con sospecha de TH en nuestro centro resultaron ser un LDCBG secundario no clonalmente relacionado.

En cuanto al efecto del esquema terapéutico administrado durante la etapa indolente en el riesgo de TH de los pacientes con LF, de acuerdo con lo descrito en la bibliografía,²⁻⁴ los resultados obtenidos en el primer trabajo reafirman que la ausencia de tratamiento durante la etapa indolente se asocia de forma significativa e independiente con mayor riesgo de TH. Además, estos resultados parecen concordar con lo descrito acerca del papel protector del rituximab en el riesgo de TH, debido a que la mayoría de los pacientes de la serie analizada recibieron esquemas de inmunoterapia basados en este anticuerpo.⁵⁻⁷ Sin embargo, este efecto no se observó en los casos que expresaron el gen IGHV3-48 puesto que el riesgo otorgado por este gen fue más potente que el papel protector del rituximab.

En el **segundo trabajo** se quiso dar un paso más allá en la biología del LF y, para ello, se planteó un análisis de genes comúnmente descritos en LNH o relevantes en cáncer mediante el diseño de dos paneles dirigidos de secuenciación de nueva generación (NGS, por sus siglas en inglés), que también permitió comparar las tecnologías de amplicones y captura. Este trabajo mejoró los conocimientos acerca de la biología de la enfermedad y permitió identificar un sesgo en la frecuencia de alteración de los genes analizados que caracteriza a esta patología. El perfil de alteraciones resultante diferencia al LF de otras neoplasias derivadas de la célula B, contando con alteraciones principalmente en genes involucrados en modificación y regulación de la cromatina, lo que apoyaría la dependencia del LF de las alteraciones epigenéticas.⁸⁻¹² También se observaron alteraciones frecuentes en otras categorías funcionales como *señalización* y *factores de transcripción*, que sumadas a la categoría funcional *modificación epigenética*, comprenden mecanismos esenciales en el mantenimiento del programa genético de la célula B centro germinal. La perturbación de estos mecanismos podría explicar la transformación maligna y expansión clonal que tiene lugar como consecuencia del bloqueo en la diferenciación de la célula B normal.

El estudio del perfil mutacional aportó datos que contribuyen a solventar la necesidad de identificar biomarcadores o lesiones genéticas relacionadas con el pronóstico de estos pacientes, ya que permitió detectar factores biológicos en el momento del diagnóstico asociados de forma significativa e independiente con fracaso terapéutico y corta supervivencia global (SG). Entre los resultados obtenidos en este trabajo, el hallazgo más relevante fue el impacto de la complejidad génica, ya que a mayor número de genes alterados peor fue el pronóstico de los pacientes, tanto en supervivencia libre de fracaso terapéutico (SLFT) como SG, independientemente del índice FLIPI. Las alteraciones en el gen *FOXO1* mostraron asociación con SLFT acortada, por lo que su estudio podría ser útil en la valoración inicial de los pacientes con LF, con la ventaja

adicional de contar de un análisis factible tanto por metodología convencional como por técnicas de NGS. Además, este análisis detectó alteraciones en otros genes relevantes en la clínica de los pacientes, asociando alteraciones en *EZH2* con pronóstico favorable (tasas elevadas de respuesta completa a los 30 meses, CR30), y en *TP53* con pronóstico desfavorable (corta SG). Por tanto, estos resultados sugieren que los estudios genéticos en el momento del diagnóstico podrían ayudar a identificar pacientes de alto riesgo y predecir la respuesta a la terapia convencional. Sin embargo, ninguno de estos factores mostró impacto en el riesgo de TH, aunque hay que tener en cuenta que el número de pacientes analizados fue reducido.

El modelo de riesgo clínico-genético m7-FLIPI definido por Pastore A *et al.* mostró una aplicabilidad deficiente puesto que, a pesar de que las características clínicas y el esquema terapéutico aplicado fue similar al de la serie original, el m7-FLIPI no fue predictor de SLFT ni en TH en nuestra serie.¹³ Estos resultados fueron similares a los descritos en series previas donde se testa la aplicabilidad de este modelo de riesgo, lo cual se explicaría por diferencias en las poblaciones evaluadas o en el número de casos analizados.¹⁴⁻¹⁷

Los dos primeros trabajos de la presente tesis doctoral se han centrado en la búsqueda de marcadores de riesgo o lesiones genéticas que en el momento del diagnóstico permitan definir factores pronósticos de forma uniforme e independiente, tanto de SLFT (*6 o más genes alterados y/o alteraciones en el gen FOXO1*), como SG (*6 o más genes alterados*) y TH (*IGHV3-48 y/o ausencia de tratamiento para el LF*). La validación de estos resultados, integrados con datos clínicos y básicos de laboratorio, permitiría una mejora en la clasificación de los pacientes al diagnóstico según su riesgo que se traducirá en un tratamiento personalizado para el paciente, reflejando la importancia de realizar análisis genéticos y moleculares en este momento del diagnóstico.

El **tercer trabajo**, se centra en desentrañar la patogénesis de la TH a linfoma agresivo mediante el análisis de biopsias secuenciales correspondientes a distintos episodios clínicos evolutivos de la enfermedad de pacientes con LFt. El objetivo de este trabajo fue identificar particularidades, no sólo en el diagnóstico, sino también en las distintas etapas de la evolución de los pacientes con LF que sufrieron TH en nuestro centro, comparándolos con pacientes con LF sin TH en al menos 5 años y con pacientes con LDCBG *de novo*, clasificados en CGB y no-CGB según el algoritmo de Hans.¹⁸ No se observó una única alteración responsable de la TH a linfoma agresivo, por lo que cabría pensar que una alteración no es suficiente para desencadenar el proceso, sino que es necesaria la combinación de múltiples eventos que perturben y desregulen la maquinaria normal de la célula B. Esta afirmación fue apoyada por el incremento gradual del número de genes alterados y mutaciones entre las biopsias secuenciales analizadas correspondientes al diagnóstico, recaída del linfoma indolente y TH a linfoma agresivo, y demuestra una vez más la complejidad de la patogénesis de esta enfermedad. Además, en línea con el mal pronóstico descrito del gen *FOXO1* en la presente tesis doctoral, se observó cómo las alteraciones en este gen también mostraron un papel en la TH precoz, siendo menor el tiempo

hasta la transformación en estos pacientes. De la misma forma, los pacientes con FLIPI de alto riesgo en el momento del diagnóstico también mostraron menor tiempo hasta la TH, reforzando la importancia del FLIPI en el contexto del LFt.⁶

Adicionalmente, el análisis de biopsias secuenciales permitió observar cómo el conjunto de alteraciones detectadas no presentaron la misma importancia en las distintas etapas de la evolución del LF, siendo las alteraciones en los genes *CREBBP* y/o *KMT2D* las únicas lesiones genéticas identificadas en todos los casos y mantenidas durante todos los episodios de la enfermedad. Por tanto, cabe pensar que estas alteraciones podrían ser adquiridas por el clon progenitor común (CPC) y consideradas eventos *driver*, proporcionando al CPC ventajas selectivas respecto al resto de clones.^{19,20} Por otro lado y en contraposición a estudios previos, alteraciones descritas como exclusivas o específicas de la biopsia transformada fueron detectadas en episodios previos de la enfermedad. Es el caso de los genes *TP53* y/o *MYD88*, cuya alteración se detectó tanto en biopsias de la recaída del LF como del momento de la transformación. Estos resultados manifiestan la importancia de realizar estudios secuenciales que reflejen con exactitud tanto el proceso de linfomagénesis como la patogénesis de su TH, ya que la ausencia de etapas intermedias entre diagnóstico y TH reduce la información sobre la adquisición y pérdida de alteraciones.

Centrándonos sólo en los resultados de la TH, el LFt mostró un perfil de alteraciones específico y diferente al del resto de episodios de la enfermedad e, incluso, diferente al de los pacientes con LF sin TH y LDCBG *de novo*, a pesar de algunas semejanzas con el LDCBG-CGB. Por tanto, a pesar de que el LFt mostró mutaciones en genes comúnmente asociados a TH como *CCND3*,^{14,21} fueron identificadas otras en genes no descritos hasta la fecha en el LFt, ni tampoco en el LF sin TH o LDCBG *de novo*, como son *KRAS*, *NRAS* y/o *RHOA*. Estos genes, codificantes de familias proteicas homólogas, se han asociado en varias ocasiones con enfermedad agresiva, invasión tumoral y metástasis principalmente en tumores sólidos, pero también en linfomas B como linfoma de Burkitt o LDCBG, linfomas y leucemias de origen T y leucemia mieloide aguda.²²⁻²⁶ Esto explicaría el pronóstico desfavorable que adquieren los pacientes con LFt puesto que estas alteraciones, combinadas con otras como mutaciones puntuales y reordenamientos en *MYC* y/o *BCL6*, delección de *CDKN2A/B* e inactivación de *TP53*, dan lugar a un escenario complejo y de alto riesgo para estos pacientes.

El estudio secuencial hizo posible analizar en detalle la evolución del clon responsable de la enfermedad en cada uno de los casos definiendo, en concordancia con estudios previos, dos modelos de evolución clonal principales. En primer lugar, la mitad de los casos mostró un modelo de adquisición secuencial de alteraciones conocido como modelo de evolución clonal lineal, de forma que cada episodio de la enfermedad refleja las alteraciones del episodio previo junto con las adquiridas en esa fase. Por otro lado, el 50% restante mostró un modelo de evolución clonal divergente que, a su vez, se pudo subdividir en tres patrones en función cómo tuvo

lugar la divergencia de los clones dominantes. En este caso, cada etapa presenta alteraciones características y propias, además de una serie de alteraciones compartidas que ponen de manifiesto la relación clonal existente entre el linfoma indolente y su contrapartida agresiva. Si bien, en la mayoría de los estudios que analizan evolución clonal, tanto en el LF como en mieloma múltiple, leucemia linfática crónica o macroglobulinemia de Waldenström, el patrón más ampliamente definido es el modelo divergente, dejando la evolución lineal en un segundo plano.^{14;27-32} Esto da pie a pensar que los resultados de este trabajo podrían sobreestimar el modelo lineal como consecuencia del análisis de un grupo seleccionado de genes en lugar de realizar secuenciación del exoma completo. Por otra parte, la inclusión de biopsias procedentes de la recaída del LF ha permitido reclasificar casos en el modelo divergente. En cualquier caso, el clon responsable de la enfermedad tanto de los pacientes que mostraron evolución lineal como de aquellos con un patrón divergente, pareció surgir de un CPC inicial con alteraciones en *CREBBP* y/o *KMT2D*, además de la t(14;18) clásica que fue positiva en el 75% de los casos.²⁷ Este CPC parece presentar una vida prolongada y ser resistente a las terapias aplicadas, pues se detectaron recaídas y biopsias transformadas derivadas de este clon iniciador hasta 20 años después del diagnóstico del LF, hallazgo que podría explicar la naturaleza indolente que caracteriza esta patología.³³

En conclusión, los resultados obtenidos de los tres trabajos reflejan la acción coordinada de múltiples eventos y lesiones genéticas que perturban la maquinaria normal de la célula B dando lugar tanto a la transformación maligna inicial en célula neoplásica, como la TH del LF a linfoma agresivo. Por tanto, no hay una alteración concreta que desencadene la linfomagénesis y/o la TH, sino que es necesaria la combinación de varias alteraciones que den lugar a una proliferación anómala de las células responsables de la enfermedad. A pesar de ello, fue posible identificar factores biológicos en el momento del diagnóstico que ayudan a estratificar los pacientes con LF y predicen los resultados clínicos de estos en términos de SLFT y SG (*6 o más genes alterados y/o alteraciones en FOXO1*), además de identificar pacientes con riesgo incrementado de TH a linfoma agresivo (*IGHV3-48*).

En consecuencia, la presente tesis doctoral aporta información sobre la biología del LF y su contrapartida transformada, describiendo características únicas y diferenciales del resto de neoplasias de célula B madura, y de entre los distintos episodios de la enfermedad. Estos resultados hicieron posible la definición de dos modelos de evolución clonal que engloban los diferentes escenarios de TH observados, y reflejan la importancia y necesidad de realizar estudios secuenciales que profundicen y describan la patogénesis real del proceso. Estos hallazgos en combinación con los obtenidos en futuras investigaciones acerca de la alteración del número de copias, reordenamientos estructurales, polimorfismos, complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y microambiente, entre otros, aportan una visión global del panorama genético del LF que, junto con la clínica de la

enfermedad, permitirían refinar la estratificación y conseguir terapias eficaces adaptadas al riesgo de los pacientes con LF.

BIBLIOGRAFÍA

1. Sebastian E, Alcoceba M, Balanzategui A et al. Molecular characterization of immunoglobulin gene rearrangements in diffuse large B-cell lymphoma: antigen-driven origin and IGHV4-34 as a particular subgroup of the non-GCB subtype. *Am.J.Pathol.* 2012;181:1879-1888.
2. Montoto S, Davies AJ, Matthews J et al. Risk and clinical implications of transformation of follicular lymphoma to diffuse large B-cell lymphoma. *J.Clin.Oncol.* 2007;25:2426-2433.
3. Link BK, Maurer MJ, Nowakowski GS et al. Rates and outcomes of follicular lymphoma transformation in the immunochemotherapy era: a report from the University of Iowa/MayoClinic Specialized Program of Research Excellence Molecular Epidemiology Resource. *J.Clin.Oncol.* 2013;31:3272-3278.
4. Wagner-Johnston ND, Link BK, Byrtek M et al. Outcomes of transformed follicular lymphoma in the modern era: a report from the National LymphoCare Study (NLCS). *Blood* 2015;126:851-857.
5. Al-Tourah AJ, Gill KK, Chhanabhai M et al. Population-based analysis of incidence and outcome of transformed non-Hodgkin's lymphoma. *J.Clin.Oncol.* 2008;26:5165-5169.
6. Alonso-Alvarez S, Magnano L, Alcoceba M et al. Risk of, and survival following, histological transformation in follicular lymphoma in the rituximab era. A retrospective multicentre study by the Spanish GELTAMO group. *Br.J.Haematol.* 2017;178:699-708.
7. Federico M, Caballero B, Marcheselli L et al. Rituximab and the risk of transformation of follicular lymphoma: a retrospective pooled analysis. *Lancet Haematol.* 2018;5:e359-e367.
8. Loeffler M, Kreuz M, Haake A et al. Genomic and epigenomic co-evolution in follicular lymphomas. *Leukemia* 2015;29:456-463.
9. Zhang J, Dominguez-Sola D, Hussein S et al. Disruption of KMT2D perturbs germinal center B cell development and promotes lymphomagenesis. *Nat.Med.* 2015;21:1190-1198.
10. Araf S, Okosun J, Koniali L, Fitzgibbon J, Heward J. Epigenetic dysregulation in follicular lymphoma. *Epigenomics.* 2016;8:77-84.
11. Zhang J, Vlasevska S, Wells VA et al. The CREBBP Acetyltransferase Is a Haploinsufficient Tumor Suppressor in B-cell Lymphoma. *Cancer Discov.* 2017;7:322-337.
12. Korfi K, Ali S, Heward JA, Fitzgibbon J. Follicular lymphoma, a B cell malignancy addicted to epigenetic mutations. *Epigenetics.* 2017;12:370-377.
13. Pastore A, Jurinovic V, Kridel R et al. Integration of gene mutations in risk prognostication for patients receiving first-line immunochemotherapy for follicular lymphoma: a retrospective analysis of a prospective clinical trial and validation in a population-based registry. *Lancet Oncol.* 2015;16:1111-1122.
14. Kridel R, Chan FC, Mottok A et al. Histological Transformation and Progression in Follicular Lymphoma: A Clonal Evolution Study. *PLoS.Med.* 2016;13:e1002197.
15. Krysiak K, Gomez F, White BS et al. Recurrent somatic mutations affecting B-cell receptor signaling pathway genes in follicular lymphoma. *Blood* 2017;129:473-483.
16. Weigert O, Weinstock DM. The promises and challenges of using gene mutations for patient stratification in follicular lymphoma. *Blood* 2017;130:1491-1498.
17. Kridel R, Sehn LH, Gascoyne RD. Can histologic transformation of follicular lymphoma be predicted and prevented? *Blood* 2017;130:258-266.

18. 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.
19. Green MR, Gentles AJ, Nair RV et al. Hierarchy in somatic mutations arising during genomic evolution and progression of follicular lymphoma. *Blood* 2013;121:1604-1611.
20. Fischer T, Zing NPC, Chiattoni CS, Federico M, Luminari S. Transformed follicular lymphoma. *Ann.Hematol.* 2018;97:17-29.
21. Okosun J, Montoto S, Fitzgibbon J. The routes for transformation of follicular lymphoma. *Curr.Opin.Hematol.* 2016;23:385-391.
22. Kataoka K, Ogawa S. Variegated RHOA mutations in human cancers. *Exp.Hematol.* 2016;44:1123-1129.
23. Zhou JD, Yao DM, Li XX et al. KRAS overexpression independent of RAS mutations confers an adverse prognosis in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Oncotarget.* 2017;8:66087-66097.
24. Greil R, Pleyer L, Jansko B et al. Sequential immunotherapy in a patient with primary refractory Hodgkin lymphoma and novel mutations. *Oncotarget.* 2018;9:20928-20940.
25. Choi SM, Andea AA, Wang M et al. KRAS mutation in secondary malignant histiocytosis arising from low grade follicular lymphoma. *Diagn.Pathol.* 2018;13:78.
26. Liu X, Ye Q, Zhao XP et al. RAS mutations in acute myeloid leukaemia patients: A review and meta-analysis. *Clin.Chim.Acta* 2019;489:254-260.
27. Pasqualucci L, Khiabani H, Fangazio M et al. Genetics of follicular lymphoma transformation. *Cell Rep.* 2014;6:130-140.
28. Okosun J, Bodor C, Wang J et al. Integrated genomic analysis identifies recurrent mutations and evolution patterns driving the initiation and progression of follicular lymphoma. *Nat.Genet.* 2014;46:176-181.
29. Gonzalez-Rincon J, Mendez M, Gomez S et al. Unraveling transformation of follicular lymphoma to diffuse large B-cell lymphoma. *PLoS.One.* 2019;14:e0212813.
30. Bianchi G, Ghobrial IM. Biological and Clinical Implications of Clonal Heterogeneity and Clonal Evolution in Multiple Myeloma. *Curr.Cancer Ther.Rev.* 2014;10:70-79.
31. Gonzalez-Rincon J, Gomez S, Martinez N et al. Clonal dynamics monitoring during clinical evolution in chronic lymphocytic leukaemia. *Sci.Rep.* 2019;9:975.
32. Jimenez C, Alonso-Alvarez S, Alcoceba M et al. From Waldenstrom's macroglobulinemia to aggressive diffuse large B-cell lymphoma: a whole-exome analysis of abnormalities leading to transformation. *Blood Cancer J.* 2017;7:e591.
33. Carlotti E, Wrench D, Matthews J et al. Transformation of follicular lymphoma to diffuse large B-cell lymphoma may occur by divergent evolution from a common progenitor cell or by direct evolution from the follicular lymphoma clone. *Blood* 2009;113:3553-3557.

CONCLUSIONES

PRIMER TRABAJO – En relación con el estudio del reordenamiento de los genes de la cadena pesada de las inmunoglobulinas:

1. El estudio de la secuencia V(D)J en el linfoma folicular (LF) ha permitido detectar un sesgo en la frecuencia de uso de los genes IGHV que caracteriza al LF y lo diferencia de otras neoplasias de célula B madura. Este hallazgo refuerza la importancia patogénica que los diferentes genes IGHV tienen sobre las variantes histológicas de linfoma no Hodgkin.
2. El análisis de clonalidad resulta imprescindible para diferenciar entre el LF transformado y el linfoma difuso de célula B grande (LDCBG) secundario no clonalmente relacionado.
3. Algunos genes IGHV presentes en el LF (*IGHV4-34*, *IGHV3-30*) están completamente ausentes en uno o ambos tipos del LDCBG *de novo*, lo que resultaría útil en el diagnóstico diferencial entre un LDCBG derivado de la transformación histológica (TH) de un LF y un verdadero LDCBG *de novo*.
4. Los pacientes con LF que usan el gen *IGHV3-48* presentan un riesgo incrementado de TH a linfoma agresivo, independientemente de la inmunoterapia recibida, lo que apoya su importancia en la patogénesis del proceso. Este resultado sugiere su empleo como biomarcador para predecir riesgo de TH.

SEGUNDO TRABAJO – En relación con la identificación de alteraciones génicas asociadas con la evolución clínica:

1. El análisis con secuenciación de nueva generación permitió identificar un perfil de alteraciones genéticas característico del LF que afecta a genes implicados en modificación epigenética, señalización y codificantes de factores de transcripción, categorías funcionales esenciales en el mantenimiento del programa genético de la célula B centro germinal.
2. La complejidad génica según el número de genes alterados (*definida como más de 6 genes alterados*), se asocia con menor probabilidad de estar en respuesta completa a los 30 meses desde la inducción, así como de tener una supervivencia libre de fracaso terapéutico y supervivencia global acortadas, identificando un grupo de mal pronóstico independientemente del índice FLIPI.
3. Las alteraciones en el gen *FOXO1* muestran un papel esencial en la evolución clínica de los pacientes con LF, lo que sugiere su empleo como biomarcador para predecir fracaso terapéutico.

4. En nuestra serie, el modelo de riesgo clínico-genético m7-FLIPI no discriminó pacientes con diferente pronóstico, ni tampoco identificó pacientes con mayor riesgo de TH, indicando que son necesarios más estudios moleculares antes de la incorporación de este modelo a la práctica clínica diaria.

TERCER TRABAJO – En relación con el estudio molecular de la progresión y transformación histológica:

1. La transformación del LF a un linfoma agresivo es la consecuencia de la combinación de eventos específicos adquiridos que perturban y desregulan la maquinaria normal de la célula B. Por tanto, no se pudo identificar una única alteración responsable del proceso.
2. El análisis de biopsias secuenciales permitió identificar en las recaídas con histología de LF alteraciones en genes como *TP53* y/o *MYD88*, por lo que no deben considerarse como exclusivas de la TH.
3. A pesar de su semejanza con el LDCBG de tipo centro germinal, la TH muestra un perfil mutacional específico, con alteraciones en genes característicos como *CCND3*, *KRAS*, *NRAS* y/o *RHOA*.
4. Las alteraciones en el gen *FOXO1* se asocian de forma significativa con menor tiempo hasta la TH, pudiendo ser considerado un biomarcador de TH precoz.
5. El estudio secuencial definió dos modelos de evolución clonal, lineal y divergente, a partir de un clon progenitor común con alteraciones en *CREBBP* y/o *KMT2D*, describiendo variantes en cada uno de ellos que reflejan y permiten esclarecer los distintos escenarios de la enfermedad.

DIFUSIÓN DE RESULTADOS

A continuación, se expone la producción científica derivada de la presente tesis doctoral que ha permitido la difusión de los resultados durante su desarrollo:

▪ **PUBLICACIONES CIENTÍFICAS:**

1. María García-Álvarez, Sara Alonso-Álvarez, Isabel Prieto-Conde, Cristina Jiménez, M. Eugenia Sarasquete, M. Carmen Chillón, Alejandro Medina, Ana Balanzategui, Rebeca Maldonado, Alicia Antón, Noemí Puig, Marta Rodríguez, Oscar Blanco, Pilar Tamayo, Verónica González-Calle, Alejandro Martín, Ramón García-Sanz, Marcos González, M. Dolores Caballero, Miguel Alcoceba. *Immunoglobulin gene rearrangement IGHV3-48 is a predictive marker of histological transformation into aggressive lymphoma in follicular lymphomas*. **Blood Cancer Journal, Manuscrito aceptado (Anexo III) – Capítulo 1.**
2. María García-Álvarez, Sara Alonso-Álvarez, Isabel Prieto-Conde, Cristina Jiménez, M. Eugenia Sarasquete, M. Carmen Chillón, Alejandro Medina, Ana Balanzategui, Rebeca Maldonado, Alicia Antón, Noemí Puig, Oscar Blanco, Pilar Tamayo, Verónica González-Calle, Alejandro Martín, Ramón García-Sanz, Marcos González, M. Dolores Caballero, Miguel Alcoceba. *Genetic complexity impacts the clinical outcome of follicular lymphoma patients*. **Manuscrito en elaboración – Capítulo 2.**
3. Miguel Alcoceba, Sara Alonso-Álvarez, María García-Álvarez, Alejandro Martín, M. Dolores Caballero. *Unmet needs in histological transformation of follicular lymphoma: a clinical and biological review*. **Annals of Lymphoma (doi:10.21037/aol.2017.11.03.)**

▪ **COMUNICACIONES EN CONGRESOS Y REUNIONES CIENTÍFICAS:**

1. María García Álvarez, Sara Alonso Álvarez, Miguel Alcoceba, Ana Balanzategui, M. Isabel Prieto Conde, Cristina Jiménez, M. Eugenia A. Sarasquete, M. Carmen Chillón, Alicia Antón, Rebeca Maldonado, Montserrat Hernández Ruano, Rocío Corral, Luis Marín, Noemí Puig, Alejandro Martín, Norma Gutiérrez, Belén Vidriales, Oscar Blanco, Ramón García-Sanz, M. Dolores Caballero, Marcos González. *Uso de los genes de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (IGHV) en el linfoma folicular transformado*. **LVII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia (SEHH), Comunicación Oral – Capítulo 1.**
2. María García Álvarez, Sara Alonso Álvarez, Miguel Alcoceba, Ana Balanzategui, Isabel Prieto Conde, Cristina Jiménez, M. Eugenia Sarasquete, M. Carmen Chillón, Alicia Antón, Rebeca Maldonado, Montserrat Hernández Ruano, Rocío Corral, Luis Marín, Noemí Puig, Alejandro Martín, Norma

- Gutiérrez, M. Belén Vidriales, Oscar Blanco, Ramón García-Sanz, M. Dolores Caballero, Marcos González. *VDJH usage in transformed follicular lymphoma*. **20th Congress of European Hematology Association (EHA), Póster – Capítulo 1.**
3. María García Álvarez, Sara Alonso Álvarez, Miguel Alcoceba, Ana Balanzategui, Isabel Prieto Conde, Cristina Jiménez, M. Eugenia Sarasquete, M. Carmen Chillón, Alicia Antón, Rebeca Maldonado, Montserrat Hernández Ruano, Rocío Corral, Luis Marín, Noemí Puig, Alejandro Martín, Norma Gutiérrez, M. Belén Vidriales, Oscar Blanco, Ramón García-Sanz, M. Dolores Caballero, Marcos González. *VDJH usage in transformed follicular lymphoma*. **13th International Conference on Malignant Lymphoma (13-ICML), Póster – Capítulo 1.**
4. María García Álvarez, Sara Alonso Álvarez, Ana Balanzategui, Isabel Prieto Conde, Cristina Jiménez, M. Eugenia A. Sarasquete, M. Carmen Chillón, Alicia Antón, Rebeca Maldonado, Montserrat Hernández Ruano, Rocío Corral, Luis Marín, Noemí Puig, Alejandro Martín, Norma Gutiérrez, Belén Vidriales, Oscar Blanco, Ramón García-Sanz, M. Dolores Caballero, Marcos González, Miguel Alcoceba. *Uso de los genes de la cadena pesada de las inmunoglobulinas en el linfoma folicular transformado*. **VI Encuentro Científico Jóvenes Investigadores (RTICC), Póster – Capítulo 1.**
5. María García Álvarez, Sara Alonso Álvarez, Isabel Prieto Conde, Cristina Jiménez, M. Eugenia A. Sarasquete, M. Carmen Chillón, Alejandro Medina, Ana Balanzategui, Alicia Antón, Rebeca Maldonado, Montserrat Hernández-Ruano, Estrella Arnés-Moreta, Rocío Corral, Luis Marín, Noemí Puig, Norma Gutiérrez, Belén Vidriales, Oscar Blanco, Ramón García-Sanz, Alejandro Martín, M. Dolores Caballero, Marcos González, Miguel Alcoceba. *Impacto del perfil genético en la supervivencia libre de fracaso terapéutico tras primera línea con immunoquimioterapia en pacientes con linfoma folicular. Experiencia de un centro*. **LIX Congreso Nacional de la Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia (SEHH), Comunicación Oral – Capítulo 2.**
6. María García Álvarez, Sara Alonso Álvarez, Isabel Prieto Conde, Cristina Jiménez, M. Eugenia A. Sarasquete, M. Carmen Chillón, Alejandro Medina, Ana Balanzategui, Alicia Antón, Rebeca Maldonado, Montserrat Hernández-Ruano, Estrella Arnés-Moreta, Luis Marín, Verónica González de la Calle, Noemí Puig, Norma Gutiérrez, Belén Vidriales, Marta Rodríguez, Alejandro Martín, Ramón García-Sanz, Marcos González, M. Dolores Caballero, Miguel Alcoceba. *Estudio molecular de la evolución clonal de linfoma folicular a linfoma agresivo. Experiencia de un centro*. **LX Congreso Nacional de la Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia (SEHH), Comunicación Oral – Capítulo 3.**

ANEXOS

ANEXO I - Glosario de términos de NGS

A

Adaptador: secuencia corta de oligonucleótidos que se añade a los extremos de los fragmentos de ADN durante el proceso de preparación de librerías complementarias a la plataforma de secuenciación utilizada.

Amplicón: secuencia o segmento de ADN o ARN resultante de la amplificación por PCR a partir de *primers* que flanquean una región de interés.

Análisis a tiempo real (RTA): análisis primario que consiste en recoger y procesar las imágenes realizadas en cada ciclo de secuenciación.

Anotación: proceso por el cual se asigna información a cada variante a partir de bases de datos, tanto de su consecuencia a nivel proteico, como de su consecuencia clínica, patogenicidad y frecuencia en la población

B

BAM: archivo que contiene la secuencia binaria comprimida de las lecturas alineadas respecto al genoma de referencia.

Base calling: nombre que se le da al proceso “llamada de bases”, que consiste en asignar una base o nucleótido, acompañado de un valor de calidad (Q), a cada señal de fluorescencia detectada en cada ciclo de secuenciación para finalmente establecer la secuencia completa. Este proceso tiene lugar en el propio secuenciador a través de *software* integrados en el equipo.

C

Carrera (run): proceso completo de secuenciación que comprende todos los pasos que tienen lugar dentro de la plataforma, desde la amplificación hasta el *base calling* generalmente.

Cartucho: consumible de secuenciación de un solo uso que consta de depósitos numerados y sellados metálicamente, que contiene los diferentes reactivos para la secuenciación y donde se carga el pool de librerías generado en el proceso de preparación de librerías.

Cluster: conjunto de fragmentos de ADN idénticos como resultado de sucesivas rondas de amplificación a partir de un fragmento inicial, que posteriormente serán secuenciados.

D

Demultiplexado: proceso de separación de las secuencias generadas como resultado del *base calling* tras el proceso de secuenciación en función de sus índices.

Densidad de *clusters*: número de *clusters* generados por mm², dependiente de la cantidad de ADN introducido en el secuenciador, de la plataforma y del kit de secuenciación utilizados.

F

FASTA: formato de texto encabezado con el símbolo “>” seguido del identificador de secuencia y, a continuación, la secuencia de ADN, ARN o proteína.

FASTQ: archivo que contiene los datos crudos, es decir, las lecturas de secuencia en formato FASTA sin alinear además de información sobre la calidad de las bases. Se generan dos ficheros FASTQ comprimidos en formato .gzip por cada muestra secuenciada.

Flow cell: superficie o soporte sólido de vidrio, de un solo uso, donde tiene lugar la secuenciación.

G

GQX: parámetro de calidad que indica la fiabilidad con la que se asigna el genotipo.

I

Indexing QC: número de lecturas generadas por cada muestra multiplexada.

Índice (*index o barcode*): secuencia de 6 a 8 nucleótidos específica para cada muestra secuenciada y que, por tanto, la identifica para poder llevar a cabo el proceso de demultiplexado. Esta secuencia se añade al extremo de cada fragmento de ADN durante el proceso de preparación de librerías.

L

Librería: conjunto de fragmentos de tamaño homogéneo que presentan en sus extremos una construcción específica que integra el índice, los *primers* de secuenciación y las secuencias P5 y P7.

Longitud de lectura

M

Manifest: documento de texto que incluye las coordenadas genómicas de las regiones de ADN de interés, requerido por el secuenciador siempre que se utilicen los software de alineamiento y llamada de variantes integrados en él.

MiSeq Reporter (MSR): software que lleva a cabo el análisis secundario en la plataforma MiSeq de Illumina,

P

Paired-end: secuenciación de los fragmentos de ADN por ambos extremos.

Panel *custom*: panel personalizado de secuenciación dirigida diseñado por el usuario.

PCR puente: amplificación mediante PCR en la que los fragmentos de ADN recién sintetizados por la polimerasa y unidos por uno de sus extremos a la *flow cell*, son desnaturalizados y forman puentes gracias a la unión de su extremo libre con otro oligonucleótido unido covalentemente a la *flow cell*.

Porcentaje *on-target*: número de lecturas mapeadas en las regiones de interés respecto al número total de lecturas mapeadas.

Profundidad de cobertura: número de lecturas alineadas realizadas en una posición determinada que, cuanto mayor sea, mayor será la sensibilidad y confianza en la identificación de una variante.

PR2: botella que contiene el tampón de lavado para la secuenciación.

P5/P7: secuencias cortas de nucleótidos complementarias a los oligonucleótidos unidos covalentemente a la *flow cell*, que se añaden a los extremos de los fragmentos de ADN durante el proceso de preparación de librerías.

Q

Q score: calificación que indica la probabilidad de error con que una base se ha asignado a una posición en función de una escala basada en el algoritmo *Phred*.

Q30: valor de calidad que indica la probabilidad de que una base de cada 1000 asignadas sea errónea.

R

Rendimiento (*yield*): cantidad de información generada durante el proceso de secuenciación en Gb, directamente relacionada con el tipo de secuenciador y tipo de kit de secuenciación utilizado.

S

Sample sheet: fichero delimitado por comas (.csv) que almacena la información para configurar y llevar a cabo un experimento de secuenciación. Contiene la lista de muestras que incluidas, los índices de cada una junto con sus secuencias, el flujo de trabajo a emplear, la longitud de lectura deseada, y otros parámetros específicos para la secuenciación.

Secuenciación dirigida (*targeted sequencing*): aplicación de NGS basada en el diseño de paneles específicos dirigidos al estudio de genes o regiones concretas previamente seleccionadas para detectar alteraciones genéticas de interés para la patología en estudio.

Single-end: secuenciación de los fragmentos de ADN por un solo extremo.

Somatic Variant Caller: herramienta bioinformática que lleva a cabo el *variant calling*.

Sonda: secuencia de ADN biotinilada de longitud mayor que un cebador o *primer*, complementaria a la región de interés que se quiere secuenciar.

T

Terminación reversible cíclica (TRC): técnica de secuenciación por síntesis basada en el uso de ddNTPs marcados con una molécula fluorescente.

V

VAF (*variant allele frequency*): frecuencia alélica de la variante, es decir, porcentaje que refleja el número de lecturas en las que aparece una variante respecto al número de lecturas totales de esa posición.

Variant calling: nombre que se le da al proceso “llamada de variantes”, que consiste en compara las lecturas alineadas con el genoma de referencia y reportar las posiciones donde existan discrepancias o *mismatches*.

VCF (*variant calling format*): formato de texto que contiene información sobre las variantes presentes en las secuencias de interés, es decir, posiciones de las secuencias de interés donde existan discrepancias con el genoma de referencia.

ANEXO II - Cuantificación con *KAPA Library Quantification kit*

1. Fundamento de la técnica:

El kit para cuantificación de librerías mediante PCR cuantitativa (qPCR) de Kapa Biosystems (Roche NimbleGen Inc., Madison, WI) denominado *KAPA Library Quantification Kit (Illumina Platforms)*, permite llevar a cabo una cuantificación precisa, fiable y reproducible de librerías cuya secuenciación tendrá lugar en plataformas Illumina. Esta técnica se basa en la realización de una PCR cuantitativa a tiempo real empleando una master mix que contiene el colorante SYBR Green, que se intercalará inespecíficamente en la doble cadena de ADN emitiendo fluorescencia verde. Por tanto, la cuantificación de la librería se realiza amplificando mediante qPCR tanto la librería diluida como los estándares incluidos en el kit (*DNA Standard 1-6*), utilizando una mezcla denominada *qPCR KAPA SYBR FAST* y unos *primers* dirigidos a las secuencias P5 y P7 unidas a los extremos de los fragmentos, que serán compatibles con los oligonucleótidos unidos covalentemente a la *flow cell*. La enzima ADN polimerasa incluida en la mezcla *qPCR KAPA SYBR FAST* presenta la ventaja, a diferencia de otras polimerasas, de amplificar fragmentos de ADN de diversos tamaños con una eficacia similar, independientemente de su contenido en AT y GC, permitiendo su aplicación universal en la cuantificación de todas las librerías generadas de hasta 1 kb para ser secuenciadas en una plataforma Illumina.

Por último, el cálculo de la concentración de la librería problema se lleva a cabo mediante cuantificación absoluta a partir de la curva estándar o curva patrón generada utilizando los Cq promedio de cada *DNA Standard* amplificado.

2. Referencia y componentes

Se utilizó el kit completo con código KK4835 - 07960204001 para *ABI Prism™ qPCR Master Mix*, que contenía seis viales de *DNA Standards* etiquetados de 1-6 (80 µl) con un tamaño de 452 pb cada uno, una mezcla de *primers* específicos (1 ml) y la master mix (*KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix*, 5 ml) apropiada para este tipo de equipos de PCR cuantitativa (qPCR).

Se siguieron las recomendaciones del fabricante detalladas en el protocolo con código KR0405 – v8.17 compatible con plataformas Illumina, donde se puede encontrar una descripción más detallada de los productos, compatibilidad y pasos a seguir durante el método de cuantificación. De acuerdo al flujo de trabajo y los equipos de los que dispone el grupo, se llevaron a cabo una serie de modificaciones sobre este protocolo con el objetivo

de adaptar la técnica a la práctica diaria del grupo. Estas modificaciones, así como los distintos pasos del protocolo utilizado, se detallarán a continuación.

3. Flujo de trabajo (*Workflow*)

En la figura 1 se esquematiza el flujo de trabajo que se llevó a cabo durante el proceso de cuantificación con el kit de KAPA Biosystems (Roche NimbleGen Inc.), que será detallado a continuación.

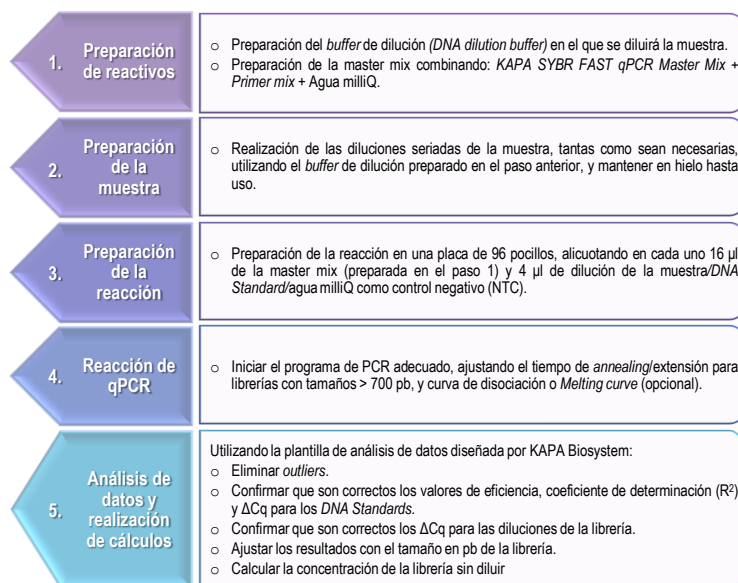


Figura 1. Esquema resumido del flujo de trabajo aplicado para llevar a cabo el proceso de cuantificación con el kit comercial KAPA Library Quantification Kit de KAPA Biosystems (Roche NimbleGen Inc.).

3.1. Protocolo detallado

Antes de comenzar con el protocolo, es imprescindible comprobar y confirmar que todos los componentes del kit están completamente descongelados y mezclados. Si el kit se usa por primera vez, añadir el Primer Mix (10X, 1 ml) al vial de KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2X, 5 ml), mezclar mediante vórtex, marcar la casilla de “*primer added*” y escribir la fecha en la que se ha añadido. Conservar a -20 °C y protegido de la luz.

1. Preparación de reactivos:

1.1 **Preparación del *buffer* de dilución** o *DNA Dilution Buffer* para llevar a cabo las diluciones seriadas de la librería que se quiere cuantificar. Para ello se realizó la siguiente mezcla (tabla 1):

Tabla 1. Reactivos y volúmenes para la preparación del *buffer* de dilución.

Reactivo	Volumen (1-6 pools)
Agua milliQ	9.9 ml
Tris 1 M pH 8.0	100 μ l
Tween 20 100%	5 μ l
Total (Buffer 10 mM Tris8, 0.05% Tween 20)	10 ml

1.2 Preparación de la Master Mix para la qPCR con los siguientes reactivos (tabla 2):

Tabla 2. Reactivos y volúmenes para la preparación de la Master Mix.

Reactivo	Volumen
KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix + Primer mix	12 μ l
Agua milliQ	4 μ l
Total	16 μl

2. Preparación de la muestra:

Se prepararon las **diluciones seriadas requeridas de la librería** (tabla 3), tantas como sean necesarias en función de la concentración esperada de la librería, usando el *DNA Dilution Buffer* preparado en el paso 1.1. Se cargaron para su cuantificación en la placa de 96 pocillos las diluciones 20K, 50K, 100K y 150K.

Tabla 3. Diluciones seriadas de la librería realizadas con el *buffer* de dilución preparado previamente.

	Paso 1: 500x	Paso 2: 10K	Paso 3: 20K	Paso 4: 50K	Paso 5: 100K	Paso 6: 150K
Librería	2 μ l	10 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l
<i>DNA Dilution Buffer</i>	998 μ l	190 μ l	100 μ l	150 μ l	100 μ l	50 μ l
Total	1000 μl	200 μl	200 μl	250 μl	200 μl	150 μl

Todas las reacciones se hicieron por triplicado, de tal forma que las concentraciones de los *DNA Standard* (STD), utilizados para crear la curva patrón, de las diluciones de la librería que se acaban de preparar (LIB) y del control negativo (NTC), para el que se utilizó agua milliQ, fueron las siguientes (tabla 4):

Tabla 4. Concentración de los *DNA Standard*, control negativo (NTC) y diluciones de la librería, así como su volumen y el número de reacciones.

	Concentración	Nº de reacciones	Volumen
STD1	20 pM	3	4 µl
STD2	2 pM	3	4 µl
STD3	0.2 pM	3	4 µl
STD4	0.02 pM	3	4 µl
STD5	0.002 pM	3	4 µl
STD6	0.0002 pM	3	4 µl
NTC	<i>DNA Dilution Buffer</i>	3	4 µl
LIB	20K	3	4 µl
LIB	50K	3	4 µl
LIB	100K	3	4 µl
LIB	150K	3	4 µl

3. Preparación de la reacción:

En una placa de 96 pocillos de la casa comercial Applied (Applied Biosystems, Foster City, CA) se alicuotaron **16 µl de Master Mix**, preparada en el paso 1.2, en cada pocillo y **4 µl de STD/LIB/NTC** en cada pocillo correspondiente según la plantilla de la figura 2. La placa se selló con un *film* adhesivo transparente para evitar la evaporación.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	STD1	STD1	STD1							LIB 20K	LIB 20K	LIB 20K
B	STD2	STD2	STD2							LIB 50K	LIB 50K	LIB 50K
C	STD3	STD3	STD3							LIB 100K	LIB 100K	LIB 100K
D	STD4	STD4	STD4							LIB 150K	LIB 150K	LIB 150K
E	STD5	STD5	STD5									
F	STD6	STD6	STD6									
G												
H	NTC	NTC	NTC									

Figura 2. Representación esquemática de la plantilla de una placa de 96 pocillos para el ensayo de qPCR de KAPA Biosystems. En la figura se representa de forma esquemática la localización de cada reacción individual donde tendrá lugar el proceso de qPCR, separando las reacciones que contienen las diferentes diluciones de la librería de los *DNA Standard* y del control negativo (NTC) para evitar contaminación.

4. Reacción de qPCR:

El equipo utilizado para llevar a cabo la reacción de qPCR fue el equipo StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA), en el que se programó la siguiente reacción:

- **Paso 1:** 5 minutos a 95°C
- **Paso 2:** 30 segundos a 95°C
- **Paso 3:** 45 segundos a 60°C
- **Paso 4:** Repetir 34 veces los pasos 2-3, para un total de **35 ciclos**
- **Paso 5:** ∞ a 95°C para *Melt Curve*

5. Análisis de datos y realización de cálculos:

Los resultados de la qPCR fueron exportados para ser analizados utilizando la plantilla *KAPA Quantification Data Analysis Template v4.14 (Illumina platforms)* diseñada para el análisis de datos de cuantificación de librerías por la casa comercial Kapa Biosystems (Roche NimbleGen Inc.), siguiendo las instrucciones del fabricante recogidas en la primera hoja de esta plantilla (*Readme*).

A continuación, en la figura 3 se muestra un ejemplo de cómo es la visualización de los datos en dicha plantilla, además de un ejemplo de una *Melt curve* en la que se puede detectar la presencia de dímeros de adaptadores.

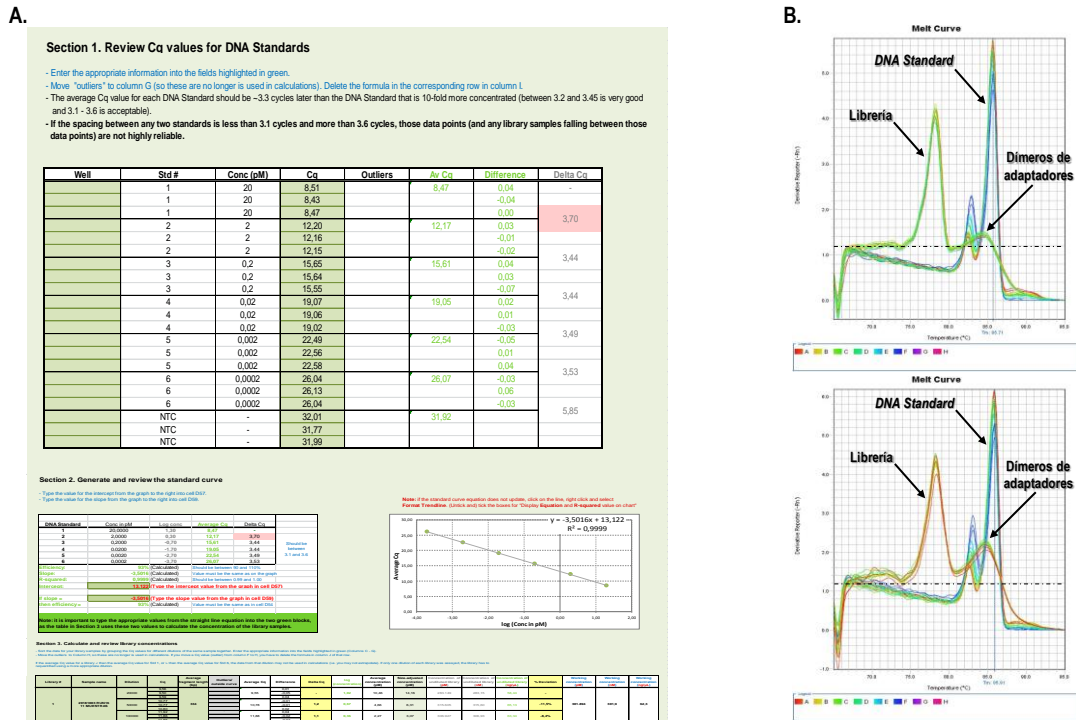


Figura 3. Visualización de los resultados de la qPCR de KAPA Biosystems (Roche NimbleGen Inc.) y la curva de disociación o *Melt curve*. (A) En la figura se muestran las tres secciones incluidas en la plantilla *KAPA Quantification Data Analysis Template v4.14 (Illumina platforms)* para el análisis de datos de cuantificación de librerías. En la sección 1 se añaden los Cq de los estándares y el control negativo (NTC) con el objetivo de detectar y eliminar los *outliers* para la elaboración de una curva precisa, reflejada en la sección 2. En la sección 3 se añaden los Cq de las diferentes diluciones realizadas de la librería, indicando los factores de dilución y el tamaño de la misma, para obtener la concentración final en varias unidades. **(B)** En esta figura se pueden observar dos ejemplos de una curva de disociación o *Melt curve* de la librería y de los *DNA Standard*, que permite detectar la presencia de dímeros de adaptadores. En el ejemplo superior, la cantidad de dímeros es muy baja, casi inapreciable, por lo que daríamos como válido el dato de concentración de dicha librería; mientras que en el ejemplo inferior, la cantidad es más elevada e inaceptable, ya que produciría una sobreestimación de la concentración de la librería. La *Melt curve* de los *DNA Standard* presenta la peculiaridad de mostrar un doble pico en todos los ensayos.

ANEXO III - Artículo aceptado en *Blood Cancer Journal*

IMMUNOGLOBULIN GENE REARRANGEMENT IGHV3-48 IS A PREDICTIVE MARKER OF HISTOLOGICAL TRANSFORMATION INTO AGGRESSIVE LYMPHOMA IN FOLLICULAR LYMPHOMAS

María García-Álvarez,¹ Sara Alonso-Álvarez,² Isabel Prieto-Conde,¹ Cristina Jiménez,¹ M. Eugenia Sarasquete,^{1,3} M. Carmen Chillón,^{1,3} Alejandro Medina,¹ Ana Balanzategui,¹ Rebeca Maldonado,¹ Alicia Antón,¹ Noemí Puig,^{1,3} Marta Rodríguez,⁴ Oscar Blanco,⁴ Pilar Tamayo,⁵ Verónica González-Calle,¹ Alejandro Martín,^{1,3} Ramón García-Sanz,^{1,3,6} Marcos González,^{1,3,6} M. Dolores Caballero,^{1,3} Miguel Alcoceba,^{1,3}

¹Department of Hematology, University Hospital of Salamanca (HUS/IBSAL), Spain; ²Department of Hematology, Central University Hospital of Asturias (HUCA), Oviedo, Spain; ³Biomedical Research Networking Centre – Oncology (CIBERONC); ⁴Department of Pathology, University Hospital of Salamanca (HUS/IBSAL), Spain; ⁵Department of Nuclear Medicine, University Hospital of Salamanca (HUS/IBSAL), Spain; ⁶Cancer Research Centre - IBMCC (USAL-CSIC). Salamanca, Spain

KEYWORDS: Follicular Lymphoma, Histological Transformation, V-D-J Rearrangement, Somatic Hypermutation

CORRESPONDENCE TO:

Dr. RAMÓN GARCÍA-SANZ

Servicio de Hematología
Hospital Universitario de Salamanca
Pº San Vicente 58-182
37007-Salamanca (Spain)
TELEPHONE: +34 923 291384
FAX: +34 923 294624
E-MAIL: rgarcias@usal.es

CONFLICT OF INTEREST: The authors reports grants PI15/01393, CAS102P17, GRS 1180/A/15, GLD17/00334, CIBERONC-CB16/12/00233 during the conduct of the study, and from Gilead Sciences (GLD15/00348, GLD16/00162), Incyte, Janssen, and Amgen outside the submitted work. MGA, IPC, CJ, VGC, and MES are or were supported by the Spanish government (ISCIII and/or FEHH). Consulting fees and/or non-financial support were reported from Abbvie (MG), Amgen (NP, MDC), BMS (RGS, MDC), Celgene (NP, AM, MDC), Gilead (AM, MG, MDC), Incyte (RGS), Janssen (NP, AM, RGS, MG, MDC, MA), Kite (MDC), MSD (MDC), Novartis (SAA, MDC), Prothena (VGC), Roche (AM, MG, MDC), Servier (AM), Takeda (NP, RGS, MDC), and Weber (NP). The remaining authors have no relevant conflicts of interest to disclose. RGS is the president of the Spanish Society of Haematology.

ABSTRACT

Follicular lymphoma (FL) is a heterogeneous disease whose pathogenesis remains partially unknown. Around 20% of FL patients experience early progression or treatment-refractory disease and 2-3% of patients per year experience histological transformation (HT) into a more aggressive lymphoma (tFL). Here, we evaluate the immunoglobulin heavy chain variable (IGHV) gene usage and mutational status in 187 FL cases to assess its impact on clinical outcome and histological transformation. The IGHV gene repertoire was remarkably biased in FL. The IGHV4-34 (14%), IGHV3-23 (14%), IGHV3-48 (10%), IGHV3-30 (9%) and IGHV3-21 (7%) genes accounted for more than half of the whole cohort. IGHV3-48 was overrepresented in cases of tFL (19%) compared with non-transformed FL at 5 years (5%, $P=0.05$). Patients with the IGHV3-48 gene were significantly more likely to have had HT after 10 years than those who used other genes (71% vs. 25%, $P<0.05$), irrespective of the therapy they received. Moreover, IGHV3-30 was also overrepresented in cases of FL (9%) and tFL (13%) compared with diffuse large B-cell lymphoma in which it was nearly absent. In conclusion, our results indicate a role for antigen selection in the development of FL, while the use of IGHV3-48 could help predict histological transformation.

INTRODUCTION

Follicular lymphoma (FL) is the most common indolent non-Hodgkin lymphoma (NHL, 20-30%), with an incidence of 12.5 new cases per 100 000 inhabitants/year. FL is typically characterized by a non-aggressive nature, usually responds successfully to first-line therapy, and has a median survival of 15 to 20 years.(ref.1-3)

FL is considered an incurable disease that is characterized by a pattern of multiple relapses, a decreasing duration of response, and a gradual acquisition of resistance to different drugs. Despite the improvement in treatment effectiveness due to the incorporation of immunochemotherapy regimens, including anti-CD20 monoclonal antibody, 20% of patients experience early progression or develop a treatment-resistant disease within two years of receiving first-line therapy.(ref.2;4;5) Furthermore, FL can undergo histological transformation (HT) into a more aggressive lymphoma, most commonly to diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), with a transformation rate of 2-3% per year.(ref.6-8) Transformed follicular lymphoma (tFL) involves a clonal relationship between the initial FL and the aggressive form and it is considered to be one of the most unfavorable events in the natural history of FL,(ref.9) because transformation has customarily been associated with low cure rates with conventional therapies and short survival.(ref.10) Several prognostic indices for FL, such as the Follicular Lymphoma International Prognostic Index (FLIPI),(ref.11) FLIPI2 (ref.12) or the recently described complete response rate at 30 months (CR30)(ref.4) have been defined because of the need to identify high-risk group of patients. However, FLIPI perform poorly in terms of specificity to predict transformation,(ref.13) and the remaining indexes are not useful to predict histological transformation. Unraveling the biology and pathogenesis of this disease would improve the identification of poor-prognosis groups at the time of diagnosis and might enable risk-adapted treatment strategies to be employed.

FL arises from the clonal proliferation of germinal center (GC) B-cells, which have experienced malignant transformation, resulting in a follicular pattern with architectural features typical of normal germinal centers.(ref.3;14) These GC B-cells harbor a clonal rearrangement of the immunoglobulin heavy chain gene (IGH), which occurs during B-cell differentiation to generate a completely functional variable (IGHV)-diversity (IGHD)-joining (IGHJ) junction in the IGH gene. The IGHV gene repertoire and somatic hypermutation status has been extensively analyzed in B-cell lymphomas, showing a biased use of IGHV genes in chronic lymphocytic leukemia (CLL), DLBCL, splenic marginal zone lymphoma (SMZL), Waldenström macroglobulinemia (WM), mantle cell lymphoma

(MCL) and primary central nervous system lymphoma.(ref.15-22) Some IGHV genes have also been associated with clinical outcome. Thus, the unmutated status of the IGHV rearrangement, or the presence of those IGHV3-21 belonging to the stereotyped B-cell receptor subset #2 are associated with unfavorable prognosis in CLL.(ref.16;17;23;24)

In the case of FL, the IGHV repertoire has only occasionally been reported in small series, and without any clinical associations.(ref.25-27) Recently, Berget et al. reported an association in a series of 106 FL patients between the presence of IGHV5 or to use more than one IGHV subgroup and poor survival.(ref.14) However, there is no information about the role of IGHV rearrangements in the treatment response or the risk of HT.

The aim of the present study was to analyze in detail the use of IGHV, IGHD and IGHJ genes and the somatic hypermutation (SHM) rate in the largest FL series to date, to improve our understanding of the biology of FL and its impact on clinical outcome and the risk of histological transformation.

PATIENTS AND METHODS

Patient Characteristics

The study included a total of 187 consecutive patients with histologically confirmed FL grade I-IIIa according to the 2017 WHO classification (ref.3) diagnosed between January 1995 and May 2017 (Supplemental Figure S1). FL grade IIIB and composite cases of FL+DLBCL were excluded.(ref.28) Cases without biological sample and/or clinical data were also excluded.

Clinical characteristics of the cohort are described in Table 1. The median age at diagnosis was 58 years (range 19-87 years) and 53% of the patients were females. Within our series, 36% of the patients were high-risk according to FLIPI criteria. One hundred sixty-three patients received treatment, of whom 98 (60%) received rituximab-based immunochemotherapy (R-ICT) -R-CHOP/R-CHOP-like therapy in most of them (72/98 cases, 73%)-, and 65 (40%) received other schemes without rituximab. Seventy-three patients (39%) also received rituximab as maintenance. The other 24 patients (13%) never were treated until the time of last follow-up or HT into aggressive lymphoma.

This study was approved by the Ethical Committee of the University Hospital of Salamanca in accordance with Spanish law and the Declaration of Helsinki. Written informed consent was obtained from all participants.

DNA Extraction

DNA was isolated on samples at the time of diagnosis of FL, and in the biopsy of those cases with documented HT. gDNA from fresh-frozen tissue (65% of cases) was isolated by the phenol-

chloroform method(ref.29) or the Maxwell® 16 System (Promega, Madison, WI, USA). In cases in which DNA was extracted from bone marrow (20%), peripheral blood (2%) and other tissues (3%), the Maxwell® 16 System (Promega) or DNAzol reagent (MRC, Cincinnati, OH, USA) was used.(ref.30) Finally, gDNA extraction from formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue (10%) was isolated using the RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation Kit (Ambion/Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) or the QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany).

DNA was quantified in a NanoDrop 1000™ Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The quality and purity of the gDNA extracted from FFPE tissue, were assessed with the 4200 TapeStation (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) system, using the Genomic DNA ScreenTape assay.

IGH Rearrangements Amplification

IGH rearrangements were amplified according to the BIOMED-2 Concerted Action protocols,(ref.31) in which the complete V-D-J rearrangement was amplified by multiplex PCR with a set of six family-specific IGHV primers of the framework region 1 (FR1), and one IGHJ consensus primer. For the samples with no detectable amplification from FR1, PCR was performed from Leader or FR2 region. The presence of the monoclonal rearrangement was then confirmed by GeneScan with an ABI 3500xL DNA Sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

IGH Rearrangement Sequencing and Identification

PCR products were sequenced in forward and reverse reads, using the same primers as for PCR amplification and the Big-Dye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems).(ref.31) Sequencing was carried out with an ABI 3500xL DNA Sequencer (Applied Biosystems).

Complete V-D-J rearrangements and the percentage of germline identity were identified using the IMGT/V-QUEST software (<http://www.imgt.org>). Sequences with germline identity less than or equal to 98% were considered to be mutated, while those with more than 98% identity were considered to be sequences without somatic hypermutation (SHM) or to be unmutated.

t(14;18) Nested PCR

The t(14;18) was amplified by nested PCR adapting the method of Gribben et al.(ref.32) using two BCL2 primers directed at major breakpoint region (MBR) and minor cluster region (mcr) in chromosome 18 and a consensus primer directed to J_H in chromosome 14. The J_H internal primer was marked with a fluorochrome for detecting BCL2 translocation size by GeneScan with an ABI 3500xL DNA Sequencer (Applied Biosystems).

Definitions and Statistical Analysis

We explored the following clinical endpoints: (i) response to induction treatment according to International Working Group criteria, based on computed tomography (CT) scans (n=130) or a ¹⁸-fluorodeoxyglucose-positron emission tomography (PET)/CT scan (n=16);(ref.33-35) (ii) complete response rate at 30 months (CR30), defined as complete response 30 months after the date induction treatment began;(ref.36) (iii) failure-free survival (FFS), defined as less than a partial response at the end of induction, relapse, progression or death;(ref.37) (iv) time to transformation (TTT), measured as the time from the date of FL diagnosis to that of histologically confirmed transformation into aggressive lymphoma (tFL),(ref.38) defined solely on the basis of pathological criteria, getting biopsies at the time of FL diagnosis and when there was a clinical suspicion of tFL; (v) histological transformation at 10 years (10y-HT), defined as the probability that HT occurred at any time within a given 10-year period; and (vi) overall survival (OS), which is the time from the date of diagnosis of FL to that of death from any cause.

Possible associations between variables were analyzed by the χ^2 -square test for categorical variables, and by Student's unpaired-samples t-test or the Mann-Whitney U test for continuous variables. P values were Bonferroni corrected (P_c) to take into account multiple testing. Survival was estimated by the Kaplan–Meier method and the differences were assessed by the log-rank test. Subsequently, all variables for which there was some indication of a significant association with clinical features in the univariate test ($P < 0.1$) were considered in a multivariate Cox regression model. Differences were considered to be statistically significant for values of $P < 0.05$. All analyses were performed using SPSS (IBM SPSS 23.0, IBM Corp, Armonk, NY, USA).

RESULTS

IGHV, IGHD and IGHJ Gene Repertoire in FL

A total of 138 clonal V-D-J rearrangements out of 187 cases (74%) were detected in our study cohort. No clonal rearrangements were identified in the other 49 cases due to their highly polyclonal background (82%) or the absence of amplification arising from the small quantity or poor quality of the available DNA (18%). Most sequences were obtained from FR1 (80%). Clinical characteristics of the cohort with clonal IGH rearrangements (n=138) in comparison with the global cohort are described in Supplemental Table S1.

IGHV3 (63%) and IGHV4 (27%) were the most frequent subgroups of clonal V-D-J rearrangements (Supplemental Table S2). A total of 35 functional IGHV genes were identified, being IGHV4-34 (14%), IGHV3-23 (14%), IGHV3-48 (10%), IGHV3-30 (9%)

and IGHV3-21 (7%) the most represented (Figure 1 and Supplemental Table S3). Of the IGHD genes, IGHD3 (37%) and IGHD2 (25%) were the most frequent subgroups (Supplemental Table S2), with IGHD3-10 (12%) and IGHD3-22 (10%) being the most frequently expressed (Supplemental Table S3). Finally, of the IGHD genes, IGHD4 (48%) was the most prevalent gene in this FL series (Supplemental Table S2). Summary list of the IGHV, IGHD and IGHD subgroups and gene usage in the present series are provided in Supplemental Tables S2-S4.

Analysis of IGHV Mutational Status in FL and VH CDR3 Length

Somatic hypermutation (SHM) was feasibly studied in 130 of 138 (94%) clonal V-D-J rearrangements. SHM was detected in 126 (97%) of them. The percentage of germline identity to the closest IGHV gene ranged from 67.2% to 100%, with a mean of 87.2%. No differences were observed in the proportions of patients with SHM between the IGHV subgroups (Supplemental Figure S2).

Only four patients (3%) in our series were unmutated, three of them with a 100% germline identity and 99.8% in the other patient. Unmutated sequences were observed in the IGHV1 and IGHV3 subgroups (Supplemental Figure S2); the affected genes were IGHV1-69, IGHV3-21 and IGHV3-30-3.

The VH CDR3 region was identified in 113/138 (82%) cases with clonal V-D-J rearrangement. The median VH CDR3 length was 16 amino acids (range 8 to 28). There were no statistically significant differences in mean length between the subgroups or genes (Supplemental Table S5).

Comparative Analysis of IGH Rearrangements in FL with Other B-LPDs and Normal B Cells

In order to identify unique characteristics of FL, we compared our FL dataset with the results reported for CD5-/IgM+ normal B cells and other B-cell lymphoproliferative disorders (B-LPDs), namely, *de novo* DLBCL, MCL, CLL, SMZL, hairy cell leukemia (HCL), multiple myeloma (MM) and WM (Table 2 and Supplemental Table S6).(ref.21;39-47) The IGHV1 subgroup was significantly underrepresented in FL relative to all B-LPDs (5% vs. 15 to 30%, $P < 0.05$, $P_c < 0.05$) except WM (7%). Conversely, IGHV3 subgroup was overrepresented in FL relative to DLBCL (63% vs. 44%, $P < 0.01$, $P_c < 0.05$), CLL (48%, $P < 0.01$, $P_c < 0.05$), MCL (52%, $P < 0.05$, $P_c < 0.1$), and MM (49%, $P < 0.01$, $P_c < 0.1$), although statistical differences were lost after Bonferroni correction in the two latter cases.

IGHV3-21 (7%), IGHV genes that are frequently used in FL, was completely absent from CD5-/IgM+ normal B cells ($P < 0.01$, $P_c < 0.05$) and relatively underrepresented in other B-LPDs.(ref.19;21;39-45;47) There were significant differences in the frequency of the IGHV3-30 gene, which was absent from DLBCL ($P < 0.01$, $P_c < 0.05$).(ref.21) IGHV4-34

was more frequent than in FL (14%) than in CD5-/IgM+ normal B cells (4%, $P < 0.01$, $P_c < 0.05$), MM (1%, $P < 0.01$, $P_c < 0.05$) or WM (0%, $P < 0.01$, $P_c = 0.06$).(ref.39;42;44;45)

Comparative Analysis of IGH Rearrangements in tFL with FL and DLBCL

In the FL series, 47 patients (25%) underwent HT into aggressive lymphoma (tFL). The clonal relationship between the paired samples (FL/tFL) was confirmed in 45/47 cases (96%) by BIOMED-2 or BCL2-IGH breakpoint analysis. Two patients were excluded because they expressed different clones at diagnosis and transformation. A total of 31 clonal V-D-J rearrangements out of 45 tFL cases (69%) were detected (31/138 (22%) total cases with IGHV gene available).

With the purpose of identifying singular characteristics of tFL, we compared these cases with those of FL without HT for a minimum of 5 years follow-up (n=63), and germinal (GCB, n=32) and non-germinal (non-GCB, n=48) center B-cell-like *de novo* DLBCL previously analyzed by our group.(ref.21) The IGHV1 subgroup was significantly underrepresented in tFL relative to the non-GCB DLBCL (3% vs. 23%, $P < 0.05$) while the IGHV3 subgroup was overrepresented in tFL compared with non-GCB DLBCL cases (74% vs. 40%, $P < 0.01$) (Supplemental Table S7-S10).

The IGHV3-48 gene was more frequent in tFL (19%) than in FL (5%, $P = 0.05$), and in non-GCB DLBCL (4%, $P < 0.05$) (Figure 2 and Supplemental Tables S10-S11). Finally, the IGHV3-30 gene, which was frequently used in tFL (13%), was completely absent from both types of DLBCL ($P < 0.05$). Similarly, the IGHV4-34 gene was overrepresented in tFL relative to GCB DLBCL, in which it was never present (16% vs. 0%, $P = 0.05$) (Figure 2 and Supplemental Tables S10-S11). Statistical significances were lost after Bonferroni correction due to the relative low number of cases in each of the groups.

Effect of IGHV gene usage and mutational status on clinical outcomes

Clinical Outcomes in Whole FL Series

In the whole series, after the median follow-up of 7.9 years (range 0.6-21.4 years) for surviving patients, 48 patients had died. The 5- and 10-year OS were 82% and 70%, respectively, and the 5-year OS for low/intermediate-risk FLIPI was 92% ($P < 0.01$). Most of the treated patients, received R-ICT (60%) and the 5- and 10-year FFS were 51% and 29%, respectively. After induction therapy, 39 patients (40%) had achieved CR and 48 patients (54%) were in CR at 30 months (CR30).

We explored the use of IGHV subgroups and genes with clinical outcome. Two FL patients with IGHV5 subgroup had poorer clinical course than the remaining patients and both died before the time of median follow-up. No correlations were observed

between the IGHV gene usage and response or CR30, even taking into account only the 130 FL patients in whom the response was assessed by CT scan. No statistically significant differences were observed between the IGHV gene and FFS or OS.

There were four unmutated patients, all of whom had an intermediate/high-risk FLIP1 status, although β 2-microglobulin was always normal. Three of these patients received R-ICT but none was in CR at 30 months (data not shown). The three cases experienced an early treatment failure, leading to a shorter 5-year FFS than found in mutated FL cases (0% vs. 57%, $P < 0.001$). Two of these cases had died due to progression of their disease 29 and 40 months after initial diagnosis.

Risk of Histological Transformation

Considering only the 45 patients who developed clonally related HT, 18 patients had died after a median follow-up of 10.2 years for surviving patients (range 1.2-21.4 years), giving a 5 and 10-year OS of 82% and 59%, respectively. The median TTT was 4.4 years after diagnosis (range: 0.1-19.6 years), with an estimated 84% of 10-year HT. Thirty-three (73%) patients received treatment as symptomatic FL. The other patients had never been treated until the date of HT into aggressive lymphoma. In this context, those who had never been treated ($n=12$) had a higher 10-year HT (100% vs. 79%, $P < 0.01$) and shorter median TTT (2.9 vs. 6.6 years, $P < 0.01$) than those who received treatment as symptomatic FL ($n=33$).

In the global series ($n=187$), the 10-year HT was significantly higher for FL patients who never received treatment than for those who were treated (85% vs. 24%, $P < 0.01$). With respect to the IGHV gene, six out of 14 (43%) patients harboring the IGHV3-48 gene at diagnosis experienced HT, resulting in a significantly higher 10-year HT than for those FL patients who had any other IGHV genes (71% vs. 25%, $P < 0.05$; Figure 3). This result did not differ after excluding those cases with limited follow-up ($n=7$ below 30 months, 5%; data not shown).

In the multivariate analysis, variables independently associated with longer 10-year HT were never treatment received (HR: 21.2, 95% CI: 6.3-70.7) and IGHV3-48 gene usage (HR: 5.0, 95% CI: 1.5-17.2) (Table 3).

DISCUSSION

Although FL is the most frequent variant of indolent non-Hodgkin lymphoma, its ontogeny is still not well understood. Our study reports the largest FL series examined to date ($n=187$) in which the use of IGHV, IGHD and IGHD genes in the clonal BCR rearrangement has been extensively characterized. We also analyze of the potential association with clinical outcome and, for the first time, the risk of histological transformation (HT). We observed a

biased use of certain IGHV genes, which provides new insight into the ontogeny of FL as part of B-cell differentiation. Thus, FL shows clear differences from other B-LPDs with regard to IGHV usage and SHM. Our findings suggest that certain antigens are involved in FL development through the stimulation of B-cells proliferation in cells expressing surface IG encoded by specific IGHV genes.

No differences were observed in the frequencies of IGHV subgroups between FL cells and CD5-/IgM+ normal B-cells, although IGHV1 frequency was slightly lower in the patient cohort.(ref.39) These numbers mirrored those of other smaller series.(ref.14;25-27;46;48;49) Conversely, significant differences were observed in the IGHV use compared with CD5-/IgM+ normal B cells.(ref.39) Thus, there was a strong bias towards higher gene usage of IGHV4-34, IGHV3-23, IGHV3-48, IGHV3-30 and IGHV3-21 in FL, these cases involving around half of the patient cohort. These results are similar to those previously reported, although IGHV4-34 gene was more frequent in our series than in other FL series, probably due to differences in sample size or geographic distribution.(ref.50) Compared with other B-LPDs, we also note a bias in IGHV gene usage in FL. The most interesting finding may be the high frequency of the IGHV3-30 and IGHV4-34 genes in tFL compared with their very low frequency or complete absence in GCB or non-GCB DLBCL.(ref.21;51;52) The increased selection of IGHV4-34 in tFL would favor a more immature cell of origin or with an extra-germinal center development. This information could be very helpful at diagnosis for distinguishing between DLBCL originating from histological transformation and true *de novo* DLBCL. Nevertheless, an analysis of a larger series is desirable in order to confirm this relationship. Taken together, these findings suggest that certain antigens participate in the lymphomagenesis of FL by stimulating the expression of surface IGS encoded by specific IGHV genes.

We analyzed the influence of the IGHV gene usage and SHM on clinical outcomes. None of the IGHV subgroups or genes appeared to be associated with clinical outcome, indicating that there is no relationship between IGHV usage and treatment requirement or response to therapy. The only relevant finding was that the two FL patients in the IGHV5 subgroup had a short survival, which is consistent with a previous report,(ref.14) although this is not sufficient to allow a definitive conclusion to be drawn. For the other IGHV genes, the low selection rate seen in FL precludes any reliable interpretation about their clinical significance. A larger series (probably of >1000 cases) needs to be analyzed, as has recently been done with CLL and MM.(ref.23;53) Something similar can be said in regard to IGHV mutational status, since only four of

our cases had unmutated IGHV, consistent with the proportions in previous reports.(ref.48;54) Nevertheless, all four unmutated cases had poor prognostic findings and short survival. A careful review of these four cases ruled out the presence of concomitant B-LPDs. The inclusion of several standard treatments with R-ICT has to be taken in consideration as a potential limitation of the present study.

In this report, we have analyzed for the first time the role of IGHV gene in histological transformation by analyzing 47 paired FL and tFL samples from the same patients. First, we confirmed the clonal relationship between each sample pair. Only two patients (4%) had a different clonal rearrangement between the two samples and were excluded from subsequent analyses. Consequently, 45 patients (24%) underwent clonally related HT into aggressive DLBCL. We observed that those FL patients in our cohort who were never treated had significantly higher 10y-HT than FL patients who received treatment, suggesting that early treatment is associated with a lower transformation risk, that is consistent with those of other studies.(ref.9;55)

The IGHV3-48 gene was associated with the risk of HT in the multivariate analysis, suggesting that it has a biological role in the transformation. Our FL series did not display a biased usage of IGHV3-48 compared with other published FL series,(ref.14;27;48) although IGHV3-48 was significantly more frequent in HT than in non-transformed FL at 5 years (19% vs. 5%). Recently, the use of rituximab as first-line treatment in FL has been associated with a reduced risk of HT.(ref.55) Since most IGHV3-48 FL cases received R-ICT, the protective effect of rituximab on HT seems not to work so well for them. In addition, IGHV3-48 FL cases were not associated to outcome probably due to some patients could be rescued by using rituximab-based therapy followed by auto-SCT to treat the transformation. Therefore, this finding implies that the IGHV3-48 gene functions as a pathogenic factor involved in transformation, as seems to happen in CLL that bear IGHV4-39 gene.(ref.56)

In summary, in the largest FL series examined to date, a particular bias in IGHV gene selection towards the clonal BCR rearrangement was observed. The selection of the IGHV3-48 gene seems to have a role in malignant transformation from FL to aggressive lymphoma. This argues in favor of the close monitoring of FL patients, examining IGHV3-48 in anticipation of a potential transformation. We also found that IGHV3-30 could contribute to the differential diagnostic process. Taken together, these results indicate a role for antigen selection in the development and transformation of FL, and suggest possibilities for future research into the biology of tFL.

Supplementary information is available at Blood Cancer Journal website

AUTHOR CONTRIBUTIONS

MGA, SAA, RGS and MA conceived and designed the study. MGA, SAA, IPC, CJ, AM, AB, RM, and AA produced the molecular results. MR and OB were the pathologists involved in the pathological and ICH review of the cases. MA and MGA analysed the data, performed the statistical analyses, and wrote the first draft of the manuscript. VGC incorporated the clinical data into the database, and checked data for inconsistencies. MES and MCC provided statistical support. NP, AM, RGS, MG, and MDC provided patient samples and/or clinical data. VGC, AM, RGS, and MG reviewed the final manuscript. MG, MA and MDC obtained funding for the study. RGS, the head of the group, produced the final revision of the manuscript and gave final approval its publication.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was partially supported by the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Spanish Ministry of Economy and Competitiveness PI15/01393, RD12/0036/0069, CIBERONC-CB16/12/00233, and “Una manera de hacer Europa” (Innocampus; CEI-2010-1-0010)”, the Education Council or Health Council of the Junta de Castilla y León (CAS102P17, GRS 1180/A/15), and Gilead Sciences (GLD17/00334). MGA, IPC, and CJ are supported by the Fundación Española de Hematología y Hemoterapia (FEHH, co-funded by Fundación Cris in the latter case), and MES by the ISCIII (CP118/00028). All Spanish funding is co-sponsored by the European Union FEDER program. The authors wish to thank Felicitación García, Montserrat Hernández-Ruano, Estrella Arnés, Mercedes Jiménez, Alejandra Martín, Isabel Sánchez, Rocío Corral and Francisco Boix (University Hospital of Salamanca, Spain) for their technical support, and Phil Mason, for checking the English grammar of the manuscript. The authors are also very grateful to the patients who participated in this study.

REFERENCES

- (1) Lackraj T, Goswami R, Kridel R. Pathogenesis of follicular lymphoma. *Best Pract Res Clin Haematol* 2018 Mar;31(1):2-14.
- (2) Salles G, Seymour JF, Offner F, Lopez-Guillermo A, Belada D, Xerri L, et al. Rituximab maintenance for 2 years in patients with high tumour burden follicular lymphoma responding to rituximab plus chemotherapy (PRIMA): a phase 3, randomised controlled trial. *Lancet* 2011 Jan 1;377(9759):42-51.
- (3) Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Revised 4th

- Edition. International Agency for Research on Cancer: Lyon ed. IARC Press; 2017.
- (4) Casulo C, Byrtek M, Dawson KL, Zhou X, Farber CM, Flowers CR, et al. Early Relapse of Follicular Lymphoma After Rituximab Plus Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine, and Prednisone Defines Patients at High Risk for Death: An Analysis From the National LymphoCare Study. *J Clin Oncol* 2015 Aug 10;33(23):2516-22.
 - (5) Flinn IW, van der JR, Kahl BS, Wood P, Hawkins TE, Macdonald D, et al. Randomized trial of bendamustine-rituximab or R-CHOP/R-CVP in first-line treatment of indolent NHL or MCL: the BRIGTH study. *Blood* 2014 May 8;123(19):2944-52.
 - (6) Alcoceba M, Alonso-Alvarez S, García-Álvarez M, Martín A, Caballero MD. Unmet needs in histological transformation of follicular lymphoma: a clinical and biological review. *Ann.Lymphoma* 1. 21-11-2017.
 - (7) Fischer T, Zing NPC, Chiattoni CS, Federico M, Luminari S. Transformed follicular lymphoma. *Ann Hematol* 2018 Jan;97(1):17-29.
 - (8) Casulo C, Burack WR, Friedberg JW. Transformed follicular non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 2015 Jan 1;125(1):40-7.
 - (9) Alonso-Alvarez S, Magnano L, Alcoceba M, ndrade-Campos M, Espinosa-Lara N, Rodriguez G, et al. Risk of, and survival following, histological transformation in follicular lymphoma in the rituximab era. A retrospective multicentre study by the Spanish GELTAMO group. *Br J Haematol* 2017 Sep;178(5):699-708.
 - (10) Montoto S, Davies AJ, Matthews J, Calaminici M, Norton AJ, Amess J, et al. Risk and clinical implications of transformation of follicular lymphoma to diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 2007 Jun 10;25(17):2426-33.
 - (11) Solal-Celigny P, Roy P, Colombat P, White J, Armitage JO, rranz-Saez R, et al. Follicular lymphoma international prognostic index. *Blood* 2004 Sep 1;104(5):1258-65.
 - (12) Federico M, Bellei M, Marcheselli L, Luminari S, Lopez-Guillermo A, Vitolo U, et al. Follicular lymphoma international prognostic index 2: a new prognostic index for follicular lymphoma developed by the international follicular lymphoma prognostic factor project. *J Clin Oncol* 2009 Sep 20;27(27):4555-62.
 - (13) Kridel R, Sehn LH, Gascoyne RD. Can histologic transformation of follicular lymphoma be predicted and prevented? *Blood* 2017 Jul 20;130(3):258-66.
 - (14) Berget E, Molven A, Lokeland T, Helgeland L, Vintermyr OK. IGHV gene usage and mutational status in follicular lymphoma: Correlations with prognosis and patient age. *Leuk Res* 2015 Jul;39(7):702-8.
 - (15) Damle RN, Wasil T, Fais F, Ghiotto F, Valetto A, Allen SL, et al. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999 Sep 15;94(6):1840-7.
 - (16) Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999 Sep 15;94(6):1848-54.
 - (17) Tobin G, Thunberg U, Johnson A, Thorn I, Soderberg O, Hultdin M, et al. Somatic mutated Ig V(H)3-21 genes characterize a new subset of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002 Mar 15;99(6):2262-4.
 - (18) Camacho FI, Algara P, Rodriguez A, Ruiz-Ballesteros E, Mollejo M, Martinez N, et al. Molecular heterogeneity in MCL defined by the use of specific VH genes and the frequency of somatic mutations. *Blood* 2003 May 15;101(10):4042-6.
 - (19) Martin-Jimenez P, Garcia-Sanz R, Balanzategui A, Alcoceba M, Ocio E, Sanchez ML, et al. Molecular characterization of heavy chain immunoglobulin gene rearrangements in Waldenstrom's macroglobulinemia and IgM monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Haematologica* 2007 May;92(5):635-42.
 - (20) Zuckerman NS, McCann KJ, Ottensmeier CH, Barak M, Shahaf G, Edelman H, et al. Ig gene diversification and selection in follicular lymphoma, diffuse large B cell lymphoma and primary central nervous system lymphoma revealed by lineage tree and mutation analyses. *Int Immunol* 2010 Nov;22(11):875-87.
 - (21) Sebastian E, Alcoceba M, Balanzategui A, Marin L, Montes-Moreno S, Flores T, et al. Molecular characterization of immunoglobulin gene rearrangements in diffuse large B-cell lymphoma: antigen-driven origin and IGHV4-34 as a particular subgroup of the non-GCB subtype. *Am J Pathol* 2012 Nov;181(5):1879-88.
 - (22) Brisou G, Verney A, Wenner T, Baseggio L, Felman P, Callet-Bauchu E, et al. A restricted IGHV gene repertoire in splenic marginal zone lymphoma is associated with autoimmune disorders. *Haematologica* 2014 Oct;99(10):e197-e198.
 - (23) Ghia EM, Jain S, Widhopf GF, Rassenti LZ, Keating MJ, Wierda WG, et al. Use of IGHV3-21 in chronic lymphocytic leukemia is associated with high-risk disease and reflects antigen-driven, post-germinal center leukemogenic selection. *Blood* 2008 May 15;111(10):5101-8.
 - (24) Baliakas P, Agathangelidis A, Hadzidimitriou A, Sutton LA, Minga E, Tsanousa A, et al. Not all IGHV3-21 chronic lymphocytic leukemias are equal: prognostic considerations. *Blood* 2015 Jan 29;125(5):856-9.
 - (25) Bahler DW, Campbell MJ, Hart S, Miller RA, Levy S, Levy R. Ig VH gene expression among human follicular lymphomas. *Blood* 1991 Sep 15;78(6):1561-8.
 - (26) Noppe SM, Heirman C, Bakkus MH, Brissinck J, Schots R, Thielemans K. The genetic variability of the VH genes in follicular lymphoma: the impact of the hypermutation mechanism. *Br J Haematol* 1999 Dec;107(3):625-40.
 - (27) Aarts WM, Bende RJ, Steenbergen EJ, Kluin PM, Ooms EC, Pals ST, et al. Variable heavy chain gene analysis of follicular lymphomas: correlation between heavy chain isotype expression and somatic mutation load. *Blood* 2000 May 1;95(9):2922-9.
 - (28) Lynch RC, Gratzinger D, Advani RH. Clinical Impact of the 2016 Update to the WHO Lymphoma Classification. *Curr Treat Options Oncol* 2017 Jul;18(7):45.
 - (29) Casaril AE, de Oliveira LP, Alonso DP, de Oliveira EF, Gomes Barrios SP, de OM, I, et al. Standardization of DNA extraction from sand flies: Application to genotyping by next generation sequencing. *Exp Parasitol* 2017 Jun;177:66-72.
 - (30) Gonzalez M, Gonzalez D, Lopez-Perez R, Garcia-Sanz R, Chillon MC, Balanzategui A, et al. Heteroduplex analysis of VDJ amplified segments from

- rearranged IgH genes for clonality assessments in B-cell non-Hodgkin's lymphoma. A comparison between different strategies. *Haematologica* 1999 Sep;84(9):779-84.
- (31) Van Dongen JJ, Langerak AW, Bruggemann M, Evans PA, Hummel M, Lavender FL, et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia* 2003 Dec;17(12):2257-317.
- (32) Gribben JG, Freedman A, Woo SD, Blake K, Shu RS, Freeman G, et al. All advanced stage non-Hodgkin's lymphomas with a polymerase chain reaction amplifiable breakpoint of bcl-2 have residual cells containing the bcl-2 rearrangement at evaluation and after treatment. *Blood* 1991 Dec 15;78(12):3275-80.
- (33) Cheson BD, Horning SJ, Coiffier B, Shipp MA, Fisher RI, Connors JM, et al. Report of an international workshop to standardize response criteria for non-Hodgkin's lymphomas. NCI Sponsored International Working Group. *J Clin Oncol* 1999 Apr;17(4):1244.
- (34) Cheson BD, Pfistner B, Juweid ME, Gascoyne RD, Specht L, Horning SJ, et al. Revised response criteria for malignant lymphoma. *J Clin Oncol* 2007 Feb 10;25(5):579-86.
- (35) Cheson BD, Fisher RI, Barrington SF, Cavalli F, Schwartz LH, Zucca E, et al. Recommendations for initial evaluation, staging, and response assessment of Hodgkin and non-Hodgkin lymphoma: the Lugano classification. *J Clin Oncol* 2014 Sep 20;32(27):3059-68.
- (36) Shi Q, Flowers CR, Hiddemann W, Marcus R, Herold M, Hagenbeek A, et al. Thirty-Month Complete Response as a Surrogate End Point in First-Line Follicular Lymphoma Therapy: An Individual Patient-Level Analysis of Multiple Randomized Trials. *J Clin Oncol* 2016 Dec 28;JCO2016708651.
- (37) Pastore A, Jurinovic V, Kridel R, Hoster E, Staiger AM, Szczepanowski M, et al. Integration of gene mutations in risk prognostication for patients receiving first-line immunochemotherapy for follicular lymphoma: a retrospective analysis of a prospective clinical trial and validation in a population-based registry. *Lancet Oncol* 2015 Sep;16(9):1111-22.
- (38) Blaker YN, Spetalen S, Brodtkorb M, Lingjaerde OC, Beiske K, Ostenstad B, et al. The tumour microenvironment influences survival and time to transformation in follicular lymphoma in the rituximab era. *Br J Haematol* 2016 Oct;175(1):102-14.
- (39) Brezinschek HP, Foster SJ, Brezinschek RI, Dorner T, Domiati-Saad R, Lipsky PE. Analysis of the human VH gene repertoire. Differential effects of selection and somatic hypermutation on human peripheral CD5(+)/IgM+ and CD5(-)/IgM+ B cells. *J Clin Invest* 1997 May 15;99(10):2488-501.
- (40) Wu YC, Kipling D, Leong HS, Martin V, Ademokun AA, Dunn-Walters DK. High-throughput immunoglobulin repertoire analysis distinguishes between human IgM memory and switched memory B-cell populations. *Blood* 2010 Aug 19;116(7):1070-8.
- (41) Hadzidimitriou A, Agathangelidis A, Darzentas N, Murray F, Lau-Larue MH, Pedersen LB, et al. Is there a role for antigen selection in mantle cell lymphoma? Immunogenetic support from a series of 807 cases. *Blood* 2011 Sep 15;118(11):3088-95.
- (42) Agathangelidis A, Darzentas N, Hadzidimitriou A, Brochet X, Murray F, Yan XJ, et al. Stereotyped B-cell receptors in one-third of chronic lymphocytic leukemia: a molecular classification with implications for targeted therapies. *Blood* 2012 May 10;119(19):4467-75.
- (43) Zibellini S, Capello D, Forconi F, Marcatili P, Rossi D, Rattotti S, et al. Stereotyped patterns of B-cell receptor in splenic marginal zone lymphoma. *Haematologica* 2010 Oct;95(10):1792-6.
- (44) Arons E, Roth L, Sapolsky J, Suntum T, Stetler-Stevenson M, Kreitman RJ. Evidence of canonical somatic hypermutation in hairy cell leukemia. *Blood* 2011 May 5;117(18):4844-51.
- (45) Gonzalez D, van der BM, Garcia-Sanz R, Fenton JA, Langerak AW, Gonzalez M, et al. Immunoglobulin gene rearrangements and the pathogenesis of multiple myeloma. *Blood* 2007 Nov 1;110(9):3112-21.
- (46) Hsu FJ, Levy R. Preferential use of the VH4 Ig gene family by diffuse large-cell lymphoma. *Blood* 1995 Oct 15;86(8):3072-82.
- (47) Martin-Jimenez P, Garcia-Sanz R, Gonzalez D, Balanzategui A, Perez JJ, Caballero MD, et al. Molecular characterization of complete and incomplete immunoglobulin heavy chain gene rearrangements in hairy cell leukemia. *Clin Lymphoma Myeloma* 2007 Nov;7(9):573-9.
- (48) Catherwood MA, Gonzalez D, Patton C, Dobbin E, Venkatraman L, Alexander HD. Improved clonality assessment in germinal centre/post-germinal centre non-Hodgkin's lymphomas with high rates of somatic hypermutation. *J Clin Pathol* 2007 May;60(5):524-8.
- (49) Rosenquist R, Lindstrom A, Holmberg D, Lindh J, Roos G. V(H) gene family utilization in different B-cell lymphoma subgroups. *Eur J Haematol* 1999 Feb;62(2):123-8.
- (50) Ghia P, Stamatopoulos K, Belessi C, Moreno C, Stella S, Guida G, et al. Geographic patterns and pathogenetic implications of IGHV gene usage in chronic lymphocytic leukemia: the lesson of the IGHV3-21 gene. *Blood* 2005 Feb 15;105(4):1678-85.
- (51) Lossos IS, Alizadeh AA, Eisen MB, Chan WC, Brown PO, Botstein D, et al. Ongoing immunoglobulin somatic mutation in germinal center B cell-like but not in activated B cell-like diffuse large cell lymphomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000 Aug 29;97(18):10209-13.
- (52) Ruminy P, Etancelin P, Couronne L, Parmentier F, Rainville V, Mareschal S, et al. The isotype of the BCR as a surrogate for the GCB and ABC molecular subtypes in diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia* 2011 Apr;25(4):681-8.
- (53) Medina A, Jiménez C, Sarasquete ME, Puig N, Balanzategui A, Alcoceba M, et al. VDJH Gene Repertoire Analysis in Multiple Myeloma (MM) Patients: Correlation with Clinical Data. *Blood* 2018; 132 (Suppl1): (abstract 4446).
- (54) Stamatopoulos K, Kosmas C, Papadaki T, Poulidou E, Belessi C, Afendaki S, et al. Follicular lymphoma immunoglobulin kappa light chains are affected by the antigen selection process, but to a lesser degree than their partner heavy chains. *Br J Haematol* 1997 Jan;96(1):132-46.
- (55) Federico M, Caballero B, Marcheselli L, Tarantino V, Manni M, Sarkozy C, et al. Rituximab and the risk of transformation of follicular lymphoma: a retrospective pooled analysis. *Lancet Haematol* 2018 Aug;5(8):e359-e367.

(56) Rossi D, Cerri M, Capello D, Deambrogi C, Rossi FM, Zucchetto A, et al. Biological and clinical risk factors of chronic lymphocytic leukaemia transformation to Richter syndrome. *Br J Haematol* 2008 Jun;142(2):202-15.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. IGHV gene repertoire in follicular lymphoma (n=138). The 35 IGHV genes expressed in our series are presented along the X-axis.

Figure 2. Comparison of the IGHV gene usage in tFL with FL without HT at 5 years and GCB/non

GCB DLBCL. The five IGHV genes most frequently expressed in our series are shown along the X-axis. *P < 0,05. GCB, germinal center B-cell-like; non-GCB, non-germinal center B-cell-like.

Figure 3. Kaplan-Meier analysis of 10-year HT by IGHV3-48 gene usage. The absence and presence of IGHV3-48 are depicted by black and grey lines, respectively. The vertical dashed line indicates 10-year follow-up.

Table 1. Clinical characteristics of FL patients (n=187).

Variable	Training cohort n (%)
Age, years (median, range)	58 (19-87)
Sex F/M	99 (53)/88 (47)
Histological grade*	
I	84 (48.8)
II	67 (39)
IIIA	21 (12.2)
FLIPI*	
0-1 (Low risk)	49 (32.9)
2 (Intermediate risk)	46 (30.9)
3-5 (High risk)	54 (36.2)
Ann Arbor*	
I	24 (14.2)
II	18 (10.7)
III	18 (10.7)
IV	109 (64.5)
First-line therapy	
Never treated	24 (12.8)
Rituximab-based ICT	98 (52.4)
R-CHOP	68 (69.4)
R-Bendamustine	11 (11.2)
R-CVP	3 (3.1)
Others	16 (16.3)
CT without rituximab	48 (25.7)
CHOP	35 (72.9)
Fludarabine-based	3 (6.3)
Others	10 (20.8)
Radiotherapy alone or with rituximab	13 (7)
Rituximab alone	4 (2.1)
Maintenance with rituximab*	73 (39)
Response after induction therapy	
CR	87 (53.7)
PR	63 (38.9)
NR/Failure	12 (7.4)

*Histological grade was available for 172 (92%) patients; FLIPI was available for 149 (80%) patients; Ann Arbor was available for 169 (90%) patients; Maintenance was calculated for 147 (79%) patients.

ICT: Immunochemotherapy; R, rituximab; CHOP, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, prednisone; CVP, cyclophosphamide, vincristine, prednisone; CT: Chemotherapy; CR: Complete response; PR: Partial response; NR: No response; FLIPI: FL International Prognosis Index.

Figure 1.

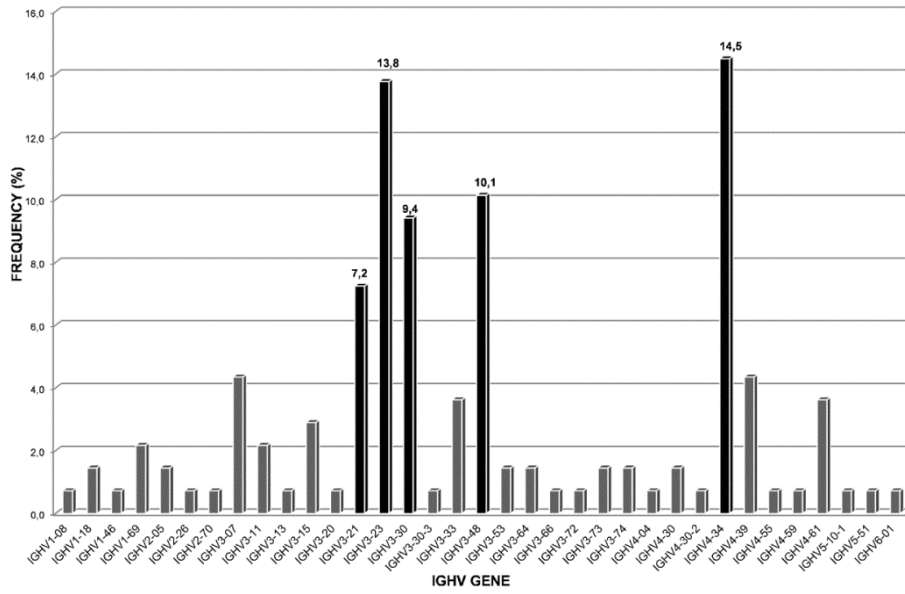


Figure 2.

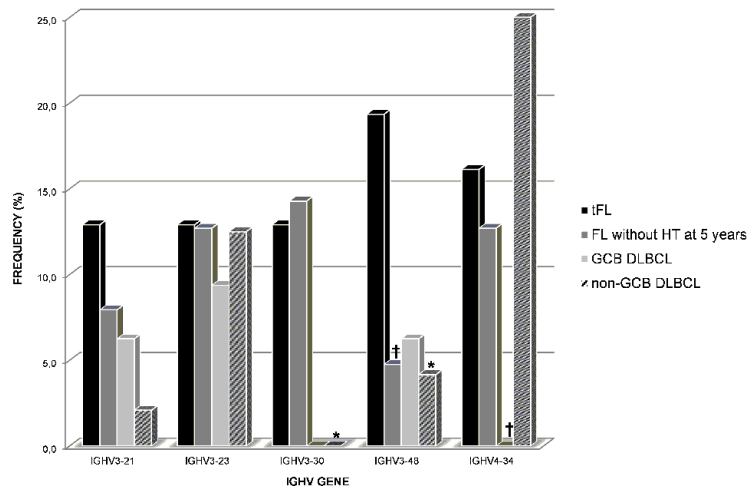


Figure 3.

