

**UNIVERSIDAD DE SALAMANCA**  
**DEPARTAMENTO DE MEDICINA**  
**HEMATOLOGÍA**



**VNiVERSIDAD**  
**D SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

**TESIS DOCTORAL**

**CARACTERIZACIÓN CLÍNICA Y BIOLÓGICA DEL PROCESO DE  
TRANSFORMACIÓN DE LOS SINDROMES LINFOPROLIFERATIVOS  
INDOLENTES**

Análisis histológico, fenotípico y molecular

**Sara Alonso Álvarez**  
**Salamanca, 2016**







D. MARCOS GONZÁLEZ DÍAZ, Doctor en Medicina, Profesor Titular de Enfermería, Jefe de Sección del Servicio de Hematología del Hospital Clínico Universitario de Salamanca.

D. MARIA DOLORES CABALLERO BARRIGÓN, Doctora en Medicina, Profesor Titular de Medicina y Jefe de Sección del Servicio de Hematología del Hospital Clínico Universitario de Salamanca.

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

CERTIFICAN:

Que el presente trabajado titulado “Caracterización clínica y biológica del proceso de transformación de los síndromes linfoproliferativos indolentes: análisis histológico, fenotípico y molecular” ha sido realizado por D.ª Sara Alonso 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 26 de abril de 2016

**Prof. D. Marcos González Díaz**

**Prof. Dra. Maria Dolores Caballero Barrigón**

**Dr. D. Miguel Alcoceba Sánchez**

**Dr. Ramón García Sanz**



A Daniel, a Carmen y a Carlos

A mis padres







# ÍNDICE GENERAL

---



## **1. INTRODUCCIÓN**

### **1.1. CONCEPTO Y CLASIFICACIÓN DE LOS SÍNDROMES LINFOPROLIFERATIVOS DE TIPO B**

- 1.1.1.El sistema inmune. Origen y maduración de las células de estirpe linfoide B
- 1.1.2.Neoplasias linfoides B. Integración con el proceso madurativo de las células B
- 1.1.3.Clasificación de la OMS de las neoplasias linfoides

### **1.2. ANÁLISIS CLÍNICO Y BIOLÓGICO DE LA TRANSFORMACIÓN DE LOS LINFOMAS INDOLENTES**

- 1.2.1.Definición de transformación del linfoma B indolente
- 1.2.2.Epidemiología y estado actual
- 1.2.3.Transformación del linfoma folicular
  - 1.2.3.1. Incidencia de transformación del linfoma folicular
  - 1.2.3.2. Criterios clínicos de transformación
  - 1.2.3.3. Pruebas metabólicas
  - 1.2.3.4. Perspectiva biológica
- 1.2.4.Otros linfomas indolentes y su proceso de transformación
  - 1.2.4.1. Leucemia linfática crónica. Desarrollo de Síndrome de Richter
  - 1.2.4.2. Linfoma de la zona marginal
  - 1.2.4.3. Linfoma linfoplasmocítico
- 1.2.5.Tratamiento del linfoma transformado
  - 1.2.5.1. Antecedentes y situación actual. El papel de la inmunoterapia
  - 1.2.5.2. Trasplante de progenitores hematopoyéticos
  - 1.2.5.3. Nuevos fármacos

## **2. HIPÓTESIS DE TRABAJO**

## **3. OBJETIVOS**

## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1. PACIENTES Y MUESTRAS**

### **4.2. MÉTODOS**

4.2.1.Revisión histológica

4.2.2.Citometría de flujo multiparamétrica

4.2.3.Extracción de ácidos nucleicos

4.2.4.Análisis de clonalidad. Estudio de los reordenamientos de los genes de Inmunoglobulinas (Igs)

4.2.5.Secuenciación del reordenamiento clonal de los genes VDJ de la cadena pesada de Igs

4.2.6.Secuenciación masiva de exoma completo

4.2.7.Estudio mediante hibridación in situ con sondas fluorescentes de los genes CMYC, BCL2, BCL6 y P53

4.2.8.Análisis estadístico

## **5. RESULTADOS**

### **5.1. CAPÍTULO 1: ASPECTOS CLÍNICOS DE LA TRANSFORMACIÓN DEL LINFOMA FOLICULAR**

5.1.1.Resumen del capítulo

5.1.2.Características de los pacientes y tratamiento

5.1.3.Incidencia de transformación histológica

5.1.4.Características clínico-biológicas en la transformación  
Respuesta al tratamiento

5.1.5.La supervivencia desde la th (sdt): papel del trasplante autólogo de progenitores

5.1.6.Linfoma transformado “de novo”, características y supervivencia desde la TH (SDT). Comparación con la serie de LFT “convencionales”

5.1.7.Impacto de la TH en la SG de los pacientes con LF

5.1.8.Discusión

### **5.2. CAPÍTULO 2: ESTUDIO FENOTÍPICO Y MOLECULAR DE LOS PACIENTES CON LINFOMAS CON LINFOMA DIFUSO DE CÉLULAS**

## **B GRANDES E HISTOLOGÍA DISCORDANTES EN LA MÉDULA ÓSEA**

5.2.1. Resumen del capítulo

5.2.2. Revisión histológica de las muestras de adenopatías y médula ósea infiltradas por linfoma. Análisis clínico de los diferentes tipos de infiltración

5.2.3. Influencia de la célula de origen del linfoma difuso de células B grandes (LDCBG) en la histología del linfoma de la médula ósea

5.2.4. Análisis inmunofenotípico de la infiltración discordante de la médula ósea

5.2.5. Correlación clonal entre adenopatía y MO

5.2.6. Análisis genético de los LDCBG con MO afectada. Frecuencia de aberraciones genéticas [traslocaciones que involucran a los genes BCL2, BCL6, CMYC y TP53]

5.2.7. Discusión

## **5.3. CAPÍTULO 3: ESTUDIO GENÉTICO (EXOMA) DE LOS PACIENTES CON LINFOMA LINFOPLASMOCÍTICO QUE EXPERIMENTAN TRANSFORMACIÓN A LINFOMA DE ALTO GRADO**

5.3.1. Resumen del capítulo

5.3.2. Identificación del perfil mutacional a lo largo de la evolución de la MW hacia LDCBG en los distintos pacientes

5.3.3. Interpretación y discusión de los resultados

5.3.3.1. Evolución clonal

5.3.3.2. Mutaciones implicadas en los diferentes momentos evolutivos

## **6. DISCUSIÓN**

## **7. CONCLUSIONES**

## **8. DIFUSIÓN DE LOS RESULTADOS**

## **9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**







# ABREVIATURAS

---



## ABREVIATURAS

<b>aa</b> Aminoácido	<b>HLA</b> Human Leukocyte Antigen
<b>ABC</b> Activated-B cell	<b>HMS</b> Hipermutación somática
<b>ADN</b> Ácido desoxirribonucleico	<b>HR</b> Hazard Ratio
<b>AID</b> Activation-induced cytidine deaminase	<b>IATH</b> Incidencia acumulada de transformación histológica
<b>AP</b> Anatomía Patológica	<b>Ig</b> Inmunoglobulina
<b>ASCT</b> Autologous stem cell transplantation	<b>IGH</b> Gen de la cadena pesada de las inmunoglobulinas
<b>HMSA</b> Hipermutación somática aberrante	<b>IGHV</b> Gen de la región variable de la cadena pesada de las inmunoglobulinas
<b>BCL2</b> B-cell CLL/lymphoma 2	<b>IGHD</b> Immunoglobulin heavy diversity
<b>BCL-6</b> B-cell CLL/lymphoma 6	<b>IGHJ</b> Immunoglobulin heavy joining
<b>BCL10</b> B-cell CLL/lymphoma 10	<b>IHQ</b> Inmunohistoquímica
<b>BCR</b> B-cell receptor	<b>IPI</b> Índice Pronóstico Internacional
<b>BLIMP1</b> B lymphocyte-induced maturation protein	<b>IRAK4</b> Interleukin-1 receptor-associated kinase 4
<b>BLNK</b>	<b>IRF4</b> Interferon-regulatory factor 4
<b>BM</b> Biología Molecular	<b>J</b> Joining
<b>BTK</b> Bruton agammaglobulinemia tyrosine kinase	<b>JAK</b> Janus Kinase
<b>C</b> Constante	<b>STAT3</b> Signal transducer and activator of transcription 3
<b>CAR</b> Chimeric antigen receptor	<b>K</b> Kappa
<b>CARD11</b> Caspase recruitment domain-containing protein 11	<b>L</b> Lambda
<b>CD40L</b> CD40 ligand	<b>LB</b> Linfoma de Burkitt
<b>CDF</b> Células dendríticas foliculares	<b>LDCBG</b> Linfoma B difuso de célula grande
<b>CDKN1A</b> Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A	<b>LDCBG, NOS</b> LDCBG not otherwise specified
<b>CDKN2A</b> Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A	<b>LCM</b> Linfoma de células del manto
<b>CDKN2B</b> Cyclin-dependent kinase inhibitor 2B	<b>LDH</b> Lactado deshidrogenasa
<b>CDR</b> Complementarity Determining Region	<b>LEZM</b> Linfoma esplénico de la zona marginal
<b>CG</b> Centro germinal	<b>LF</b> Linfoma folicular
<b>CMF</b> Citometría de flujo	<b>LFT</b> Linfoma folicular transformado
<b>CNV</b> arrays Copy number variations	<b>LH</b> Linfoma de Hodgkin
<b>CNN-LOH</b> Copy neutral number-loss of heterozygosity	<b>LLC</b> Leucemia linfática crónica
<b>COO</b> Cell of origin	<b>LNH-B</b> Linfomas no hodgkin B
<b>CPC</b> Clon precursor común	<b>LZ</b> Light zone
<b>CREBBP</b> CREB-binding protein	<b>MALT</b> Mucosa-associated lymphoid tissue
<b>D</b> Diversity	<b>MAPK</b> Mitogen-activated protein kinase
<b>DZ</b> Dark zone B terminal	<b>MDM2</b> MDM2 proto-oncogene, E3 ubiquitin protein ligase
<b>EBER</b> EBV-encoded RNA-1	<b>MEF2B</b> Myocyte enhancer factor 2B
<b>EBV</b> Epstein-Barr virus	<b>MHC</b> Major histocompatibility complex
<b>ECOG</b> Eastern Cooperative Oncology Group	<b>MLL2</b> Histona KMTD mixed lineage leukemia protein
<b>EMR</b> Enfermedad mínima residual	<b>MM</b> Mieloma múltiple
<b>EPOCH-R</b> Etoposide, prednisone, vincristine, cyclophosphamide and doxorubicin with rituximab	<b>MO</b> Médula Ósea
<b>EZH2</b> Enhancer of zeste homologue 2	<b>MUM1/IRF4</b> Melanoma associated antigen [mutated] 1/interferon regulatory factor 4
<b>FAS/TNFRSF6/CD95</b> Fas cell surface death receptor	<b>MW</b> Macroglobulinemia de Waldenstrom
<b>Fc</b> Región constante	<b>MYC</b> v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog
<b>FDG</b> Fluoro-deoxi-glucosa	<b>MYD88</b> Myeloid differentiation primary response protein 88
<b>FISH</b> Fluorescent in situ hybridization	<b>NF-κB</b> Nuclear factor of kappa
<b>FR</b> Framework	<b>NK</b> Natural killer
<b>GEP</b> Gene expression profile	<b>PAAF</b> Punción aspiración con aguja fina

## ABREVIATURAS

<b>PAX5</b> Paired box 5	<b>SNP</b> Single Nucleotide Polymorphism
<b>pb</b> pares de bases	<b>β2M</b> Beta-2 microglobulina
<b>PCR</b> Polymerase Chain Reaction	<b>STAT</b> Signal transducer and activator of transcription
<b>PD1</b> Programmed Death 1	<b>SYK</b> Spleen tyrosine kinase
<b>PDL1/CD274</b> Programmed Death Ligand 1	<b>TASPE</b> Trasplante autólogo de progenitores de sangre periférica
<b>PET</b> Tomografía de emisión de positrones	<b>TCR</b> T cell receptor.
<b>PI3K</b> Phosphoinositide 3-kinase	<b>TdT</b> Transferasa terminal de desoxinucleótidos
<b>PIM1</b> Pim-1 proto-oncogene, serine/threonine kinase	<b>TH</b> Transformación histológica
<b>PKCβ</b> Protein kinase Cβ	<b>TLR</b> Toll-like receptor
<b>PRMD1</b> PR domain containing 1, with ZNF domain	<b>TNF</b> Tumor necrosis factor
<b>R-ESHAP</b> Rituximab, Etoposide, Methylprednisolone, Cytarabine and Carboplatin.	<b>TNFAIP3</b> Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3
<b>R-CHOP</b> Rituximab, Cyclofosphamide, Doxorubicin, Vincristin and Prednisone.	<b>TNFRSF14</b> Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 14
<b>RAG1</b> Recombination activating gene 1	<b>TP53</b> Tumor protein p53
<b>RAG2</b> Recombination activating gene 2	<b>TRM</b> Treatment/Transplant related mortality
<b>RSS</b> Recombination signal sequences	<b>V(D)J</b> Variable (Diversity) Joining
<b>S</b> Switch	<b>WES</b> Whole exome sequencing
<b>SDT</b> Supervivencia desde la transformación	<b>WGBS</b> Whole genome bisulfite sequencing
<b>SG</b> Supervivencia global	<b>XBP1</b> X-box binding protein
<b>SIG</b> Surface Inmunoglobulin	
<b>SLP-B</b> Síndromes linfoproliferativos B	
<b>SNC</b> Sistema nervioso central	





# INTRODUCCIÓN

---



## INTRODUCCIÓN

### 1.1. Concepto y clasificación de los síndromes linfoproliferativos de tipo B

#### 1.1.1. El sistema inmune. Origen y maduración de las células de estirpe linfoide B

##### El sistema inmune

El sistema inmune tiene como función principal la defensa contra las infecciones microbianas. Los tejidos u órganos linfoides primarios, la médula ósea y el timo, generan las células de la defensa inmune, que se dirigen a los tejidos linfoides secundarios (ganglios linfáticos, bazo y tejido linfoide asociado a mucosas) donde completan su proceso madurativo y de afinidad y donde se logra una optimización y regulación de la respuesta defensiva.

Existen dos líneas de defensa inmune. La respuesta innata o primitiva está integrada por elementos celulares que actúan sin necesidad de un reconocimiento o contacto específico del agente patógeno y no desarrollan memoria inmune derivada de esta actividad. Las células implicadas son los neutrófilos, los macrófagos y los mastocitos, que junto con la actividad del sistema del complemento y la cascada proinflamatoria de las citoquinas, permiten completar su acción en minutos u horas desde el primer contacto con el patógeno.

El sistema inmune adaptativo o específico está formado por las células de estirpe linfoide, linfocitos, capaces de reconocer y responder frente a los antígenos extraños, y que han de ser seleccionadas para no reaccionar frente a los antígenos del propio individuo.

Existen dos tipos de linfocitos: B y T. Los linfocitos o células B llevan a cabo su proceso de maduración en la MO en el ser humano adulto, mientras que los progenitores de células T lo hacen en el timo. El mecanismo de reconocimiento de antígenos extraños por parte de los linfocitos B y T, se basa en la presencia de receptores específicos de membrana, llamados receptores específicos de antígeno, que en los linfocitos B se denominan receptores de célula B (BCR o B-cell receptor) y en los linfocitos T, receptores de célula T (TCR o T-cell receptor).

##### Maduración linfoide B

## INTRODUCCIÓN

Hoy sabemos que en los animales vertebrados, el sistema hematopoyético se desarrolla, ya en el periodo embrionario, a partir de dos “oleadas” distintas de generación de precursores hematopoyéticos.<sup>1,2</sup>

La primera oleada de células madre hematopoyéticas (CMH) en los mamíferos, se produce en el saco vitelino desde la tercera semana de gestación y produce eritrocitos nucleados primitivos que proporcionan al embrión el primer sistema de transporte de oxígeno a los tejidos. El saco vitelino también produce células mieloides que migran hacia el sistema nervioso central y a la piel para formar los macrófagos específicos de tejido (micro glía en el SNC y células de Langerhans en la piel).

La segunda tanda de progenitores se origina en la aorta dorsal del embrión y produce progenitores hematopoyéticos multipotenciales. Las células derivan del mesodermo embrionario (una de las tres hojas o capas celulares que constituyen el embrión). La diferenciación a células madre hematopoyéticas adultas y su expansión se produce inicialmente en el hígado fetal, donde ya se identifican progenitores de linfocitos B (Pre-B) en la semana octava, y linfocitos B con expresión de IgM+ en la membrana en la semana nueve.<sup>3</sup> En el hígado se establecen nidos de células proliferantes que colonizarán, después, otros órganos hematopoyéticos, como la médula ósea, que en el momento del nacimiento ya será el órgano principal de la hematopoyesis. Este modelo, cada vez más aceptado, de generación de progenitores B en “tandas” u “oleadas”, justifica los diferentes subtipos de células B maduras (denominadas B1 y B2), que parecen adaptar sus características funcionales y fenotípicas a las características del entorno y los estímulos antigénicos que van surgiendo en el proceso evolutivo del ser humano y con una co-evolución integrada con la maduración de las células T.<sup>4</sup>

Una vez revisado el origen embrionario de los precursores linfoides, analizaremos la serie de pasos que siguen los progenitores hematopoyéticos de células B para convertirse en linfocitos B maduros.

El proceso de maduración de los precursores B está regulado por la interacción de estos progenitores con las células del estroma en la MO<sup>5</sup> y la actividad de diferentes citocinas y factores de crecimiento hematopoyéticos.<sup>6</sup> El proceso de maduración implica la expresión de diferentes marcadores de

## INTRODUCCIÓN

superficie, cuyo perfil de expresión va cambiando en cada etapa evolutiva(Figura 1). En todo este proceso de maduración B, la activación y supresión de determinados genes es capital para mantener el compromiso de línea B y controlar la “promiscuidad” entre líneas. Destacaremos por su importancia a los genes IKAROS, E2A, E2F, PAX5.<sup>7</sup>

### ESQUEMA DEL DESARROLLO DE LAS CELULAS B EN LA MO (I)

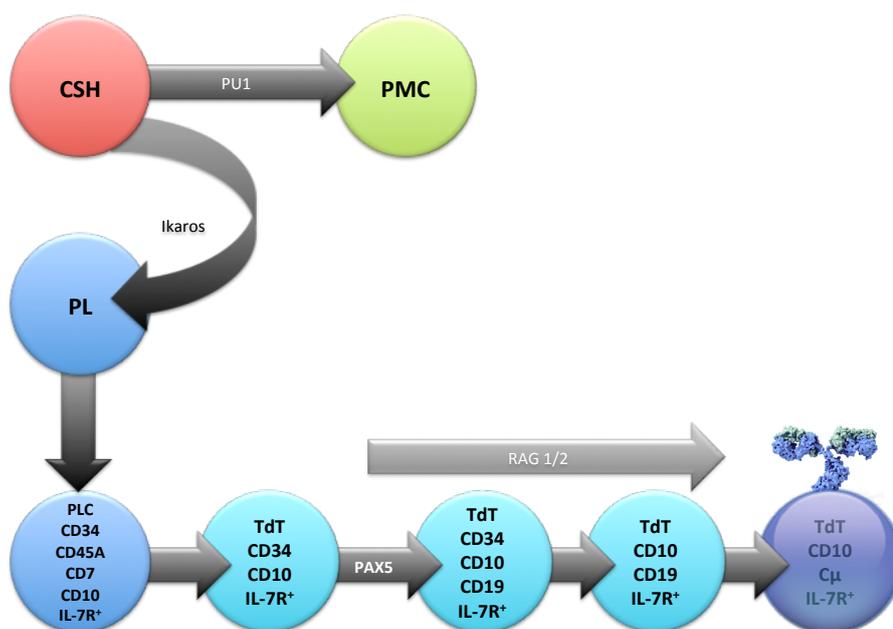


Figura 1. Maduración de la célula proB a célula preB. Adquisición de marcadores de superficie. En un primer estadio, se observa expresión de los marcadores CD7 y CD45RA, junto con CD34 y CD10. Los dos primeros se perderán y se expresará temporalmente el antígeno TdT. La expresión del gen *PAX5* implicado en el compromiso “B” de los progenitores linfoides, contribuirá con la expresión de los primeros marcadores de línea B como CD19. Tendrá lugar la pérdida de TdT, junto con los procesos de recombinación y expresión de la primera inmunoglobulina de superficie (pre-receptor de célula B) y de la cadena pesada  $\mu$  citoplasmática. Una vez llevados a cabo estos cambios, habrá comenzado la fase de célula pre-B. En esta fase, ya aparece por tanto el pre-receptor de célula B que se integra por la cadena pesada unida a las cadenas ligeras “provisionales” (representadas en verde) y que serán sustituidas por las cadenas ligeras definitivas en las siguientes etapas de maduración.

Una vez finalizado el proceso de maduración en la médula ósea, los linfocitos B viajan hasta los órganos linfoides secundarios (bazo, ganglios linfáticos y tejidos linfoides asociados a las mucosas). En primer lugar, migran al bazo donde maduran hacia células B foliculares o bien de la zona marginal. Allí se establecen como células maduras y pueden migrar a otros órganos linfoides (ganglios linfáticos, placas de Peyer o incluso el propio bazo), y allí

## INTRODUCCIÓN

podrán responder a aquellos antígenos para los que tengan capacidad de respuesta inmune.

Las reacciones inmunes deben ser capaces de responder con mayor o menor afinidad y urgencia a los estímulos antigénicos. En este contexto, existen dos tipos de respuesta: La T independiente, en la que las células B, principalmente las de la zona marginal, responden de forma rápida a estímulos poliméricos, con epítopos antigénicos repetitivos, y maduran hacia células plasmáticas, capaces de secretar IgM de baja afinidad consiguiendo una respuesta precoz. Y la respuesta T-dependiente<sup>8</sup>. Las células T colaboradoras (TH) son activadas mediante la interacción del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) de clase II y el receptor de célula T, por células presentadoras de antígenos (CPA). Las células T al contactar con células B que expresen en su CMH de clase II el antígeno para el que ellas han sido seleccionadas, podrán activarlas mediante señales de coestimulación y secreción de citocinas activadoras de la célula B. Las células B activadas proliferarán y se diferenciarán aún más. En este proceso se constituirán los centros germinales del folículo linfóide. El proceso por el que se constituyen los centros germinales continúa investigándose. Y su complejidad es tal, que no será abordado en esta tesis doctoral de forma extendida. En los folículos linfoides se dispondrán de forma periférica, en la zona del manto, las células B maduras que aún no hayan entrado en contacto con el antígeno, y dentro de esta capa, las células B que estén desarrollando la reacción del centro germinal. En la zona oscura del centro germinal, encontramos las células en proliferación (centroblastos), y en las zonas claras, células que no proliferan, (centrocitos); algunas de las células pasarán a ser células de memoria, las de menor afinidad<sup>9</sup>, y otras se diferenciarán a células plasmáticas. (Figura 3). Durante todo el proceso, sólo los linfocitos que son capaces de reconocer antígenos extraños serán seleccionados positivamente, y son los que seguirán proliferando y viendo favorecida su capacidad de maduración en perfeccionar el reconocimiento de los antígenos, mediante procesos que aumentan progresivamente la afinidad de su BCR hacia el antígeno en lo que se conoce como “maduración de la afinidad”. El proceso capital en este punto es el de la llamada hipermutación somática<sup>10</sup> cuyo objetivo es la modificación de la composición aminoacídica de las regiones de reconocimiento del receptor de

## INTRODUCCIÓN

superficie de la célula B (a través de mutaciones) para conseguir un mejor reconocimiento del antígeno. La enzima implicada en este proceso de hipermutación se llama AID (activation induced cytidine deaminase)<sup>11</sup>. Esta enzima se ha relacionado con los procesos de linfomagénesis. Y también en los centros germinales tiene lugar el cambio de isotipo de inmunoglobulina, que se produce para dar respuesta a un tipo de reacción inmune determinada (hipersensibilidad inmediata, retardada, memoria).

### ***Genes de inmunoglobulinas***

La estructura básica de las Ig está formada por dos cadenas polipeptídicas ligeras (IgL) y otras dos pesadas (IgH), ambas idénticas entre sí, unidas entre sí por puentes disulfuro. Ambos tipos de cadenas están formadas por dos regiones distintas, una constante (C) en la región carboxiterminal, y otra variable (V) en el extremo aminoterminal.<sup>12</sup>

Hay 7 genes responsables de la síntesis de estas moléculas, localizados en diferentes loci cromosómicos. En todos ellos se pueden distinguir varias regiones genéticas denominadas V (variable), D (diversidad), J (unión –joining) y C (constante), constituidas a su vez por un alto número de segmentos genéticos, responsables de la síntesis de cada una de las partes proteicas de las moléculas receptoras. Los genes que codifican la cadena pesada de las inmunoglobulinas (*IGH*) se sitúan en el cromosoma 14 (14q32)<sup>13</sup>, y los genes de las cadenas ligeras Kappa (*IGK*) y Lambda (*IgL*), en los cromosomas 2 (2p12) y 22 (22q11), respectivamente.<sup>14,15</sup>

La región constante de estos receptores antigénicos es sintetizada por los segmentos génicos C, mientras que la unión de los diferentes segmentos genéticos V(D)J es la responsable de la región variable específica de cada receptor antigénico. De este modo, la gran diversidad proteica se genera con unos pocos genes gracias a que cada linfocito B reordena sus segmentos genéticos de una manera única y diferente a la de los demás.<sup>16</sup> Y por ello, pueden codificarse una gran cantidad de receptores antígeno–específico diferentes a partir de un número pequeño de genes, economizando cantidad o “espacio” de ADN. Además, la probabilidad de encontrar dos células que tengan el mismo reordenamiento es prácticamente nula, y esta será la base

## INTRODUCCIÓN

para la identificación de linfocitos concretos y clones de linfocitos concretos.

La región constante determina el isotipo de Ig. Hay 5 tipos de moléculas proteicas de inmunoglobulinas denominadas IgG, IgA, IgD, IgE e IgM. Su diferencia estriba en el tamaño, la carga y en la composición de aminoácidos, así como en el contenido de carbohidratos.<sup>17</sup>

Comprendiendo esto, y sabiendo que cada célula pro-B posee dos alelos para el gen *IGH*, podríamos preguntarnos cuál de los dos se elige para la formación de inmunoglobulinas en cada célula pro-B en maduración. Existen algunas teorías acerca de cómo uno de ellos se recombina y el otro se excluye, y el modelo es conocido como “exclusión alélica”. La primera de las teorías que justifica la existencia de un único gen reordenado por célula, radica en la dificultad del procedimiento y el desacompasamiento del procedimiento en los diferentes alelos. La accesibilidad a la heterocromatina, por parte de las enzimas encargadas de iniciar la recombinación (RAGs), genera distintos ritmos en ambas cadenas, y sumado a la dificultad de finalizar el reordenamiento funcional completo, hace que por cuestiones estadísticas sea casi imposible que se consigan dos reordenamiento de estas características en una misma célula. El segundo modelo, va teniendo mayor aceptación, y basa su hipótesis en la inhibición que ejerce el complejo del receptor pre-B al formarse (aún sin la integración de las cadenas ligeras maduras en el receptor), a través de señales intracelulares, en el proceso de recombinación del segundo alelo.<sup>18</sup>

Como se explicó anteriormente, el primer punto crítico en la maduración es la transición de célula proB a célula preB (Figura 1), que ya es considerado un linfocito B (al expresar inmunoglobulina de superficie, aunque sea en su forma más precoz). La expresión del pre-receptor de célula se realiza gracias al acoplamiento de la primera cadena pesada sintetizada en la célula (el primer reordenamiento completo) con cadenas ligeras “provisionales” o “sustitutas”, cuyos genes se localizan en el cromosoma 22, llamadas  $V_{pre-B}$  y  $\lambda 5$ . La funcionalidad del pre-receptor B otorga ventaja evolutiva a la célula que lo expresa, y parece que juega un papel en la exclusión alélica del alelo que no ha generado aún reordenamiento completo, al inhibir la actividad de las enzimas RAG1 y RAG2, encargadas de la recombinación de los segmentos V,

## INTRODUCCIÓN

D y J, y que no permitirían continuar o finalizar la recombinación del segundo alelo. Además, las señales iniciales del pre-receptor B, reclutan mediadores de la cascada de señales del receptor de la célula B, entre ellas: Syk, BLNK, PI3K y Bruton tyrosin-kinasa, críticas para la correcta función de los linfocitos B.

En determinado momento, las células pre-B dejan de proliferar y replicarse, y comienza a reordenarse la cadena ligera definitiva (Figura 2). Hay dos tipos de cadena ligera: lambda y kappa. En el proceso de recombinación, comienza a reordenarse la cadena kappa de un alelo. Si la recombinación no es productiva se inicia el intento con el segundo alelo kappa y si ninguno de ellos consigue un reordenamiento eficaz, se realiza el reordenamiento de los genes lambda. Esto justifica la existencia de una proporción 3/2 a favor de kappa en el repertorio humano global de los linfocitos B. En el último estadio de maduración de la célula B en los órganos linfoides primarios, ya se detectan células que expresan inmunoglobulina D (cadena pesada delta, representada en verde en la imagen). Esto se debe a mecanismos de splicing o corte y empalme alternativos en el procesamiento del transcrito VDJ junto con la secuencia de la cadena pesada. Este mecanismo debe diferenciarse del mecanismo que tiene lugar en los órganos linfoides secundarios por el que se producen la maduración de la afinidad y el cambio de isotipo

### ***ESQUEMA DEL DESARROLLO DE LAS CELULAS B EN LA MO (II)***

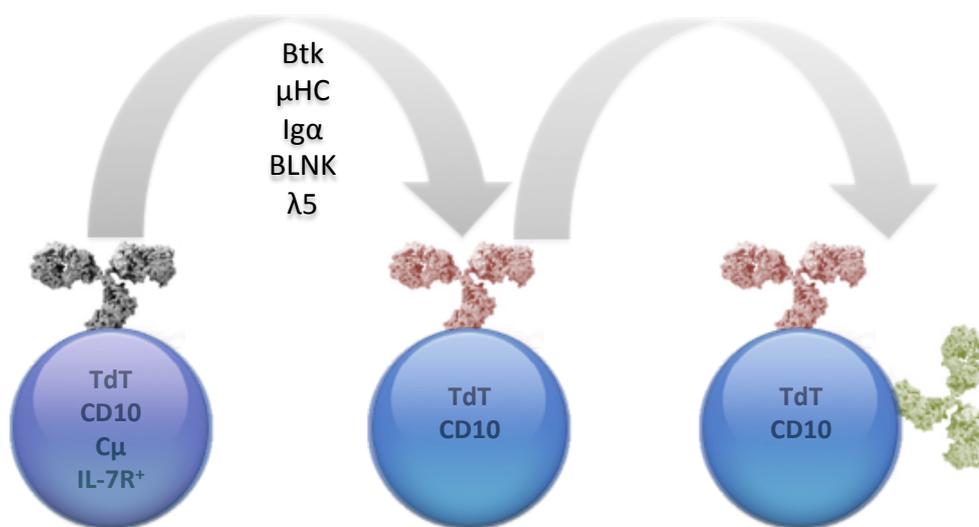


Figura 2. Maduración de la célula preB a célula B. El paso que marca la maduración de la célula preB consiste en, una vez demostrada la funcionalidad del receptor preB, proceder a la sustitución de las cadenas ligeras provisionales por las definitivas.

## INTRODUCCIÓN

### 1.1.2. Integración de las neoplasias linfoides con el proceso madurativo linfoide B

Las células B tumorales tienden a imitar las etapas de diferenciación de las células B normales, lo que constituye una base importante para su clasificación y nomenclatura. El proceso de maduración de la célula B, como se ha descrito previamente, comienza con la formación de las células B precursoras, más conocidas como linfoblastos B. Posteriormente, realizan el reordenamiento de los genes VDJ de las inmunoglobulinas para diferenciarse en células B vírgenes maduras, portadoras de inmunoglobulinas de superficie, (IgM + IgD +). Las células B vírgenes, que suelen ser CD5+, comienzan a circular en la sangre y en el proceso de recirculación de las células B, pueden ocupar los folículos linfoides primarios y las zonas del manto de los folículos linfoides. De esta manera, la mayoría de los casos de **linfoma de células del manto** parecen estar formados por linfocitos B “naive” (vírgenes) CD5+ B.<sup>19</sup>

Al encontrar un antígeno que se adapte a los receptores B o inmunoglobulinas de superficie, las células B vírgenes sufren un proceso de transformación, por el que proliferan y maduran hacia células plasmáticas secretoras de anticuerpos específicos. Otras, sin embargo, pasan a convertirse en células B de memoria. Para la maduración B, los linfocitos B “naive”, al exponerse a un antígeno, migran hacia el centro de un folículo primario, donde proliferan y entran en contacto con las células dendríticas foliculares (CDF) dando lugar a la formación de un centro germinal.<sup>8,20</sup>

Los centroblastos situados en el centro germinal expresan bajos niveles de SIG, y también disminuyen la expresión de la proteína BCL2, proteína de conocida función antiapoptótica, que confiere a estas células con baja expresión de BCL2, susceptibilidad a la muerte por apoptosis.<sup>21</sup> Estos centroblastos, además, expresan la proteína CD10 y la proteína BCL6, un factor de transcripción nuclear expresado por centroblastos y centrocitos y que no se expresa en células B vírgenes, y cuya expresión se encuentra disminuida al máximo en las células B de memoria y en las células plasmáticas<sup>22</sup>. En el centro germinal, tiene lugar la hipermutación somática de los genes de la región variable de las inmunoglobulinas que permiten que la célula B madure su afinidad por un antígeno concreto. Es también en el centro germinal donde se produce el cambio de isoforma de IG. A través de estos mecanismos, se

## INTRODUCCIÓN

producen anticuerpos IgG o IgA de mayor afinidad, que conformarán la respuesta inmune tardía, primaria o secundaria<sup>23</sup>. El gen BCL6 también sufre mutación somática en el centro germinal, sin embargo, con una tasa de mutaciones inferior a los genes de Ig<sup>24</sup>. En la formación de neoplasias linfoides, tanto la mutación de la región variable de las inmunoglobulinas y la mutación de BCL6 sirven como marcadores de células que han pasado por el centro germinal; gracias a esto, sabemos que muchos **linfomas difusos de células B grandes** se componen de células que se parecen a centroblastos, y han sufrido hipermutación somática. O que las células que originan el **linfoma de Burkitt** expresan BCL6 y han adquirido mutaciones en la región variable del gen de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (*IGHV*), y por lo tanto también se cree que corresponden a células que han pasado por el centro germinal.

Los centroblastos maduran a centrocitos, migrando a la zona clara del centro germinal. Los centrocitos, tras el paso previo de hipermutación somática, pueden haber evolucionado a células con aumento de afinidad, en cuyo caso son rescatadas de la apoptosis y comienzan a expresar nuevamente BCL2, que favorece su proliferación<sup>8</sup>. Por otro lado, se cree que la interacción célula-célula de los centrocitos con las células dendríticas foliculares (CDF) y las células T, a través de moléculas de superficie como CD23 y CD40-ligando, es responsable de un descenso en la expresión de BCL6<sup>22</sup> que logra descender la tasa proliferativa de las células B y permite su salida de los centros germinales, con diferenciación en células B de memoria o en células plasmáticas<sup>8</sup>. La expresión de BCL6 y IRF4, más conocido como MUM1, es excluyente. IRF4 / MUM1 es positivo en los centrocitos en fases de diferenciación avanzada y en las células plasmáticas, donde como hemos visto, BCL6 descende su expresión<sup>25</sup>. Los **linfomas foliculares** son tumores originados en el centro germinal (compuestos tanto por centrocitos como por centroblastos). Su formación se debería a un fallo de las células del centro germinal para someterse a apoptosis, en la mayoría de los casos debido a una reordenamiento cromosómico, t(14; 18), que impide el descenso de la expresión del gen BCL2 que, como se ha explicado previamente, debe tener lugar para permitir la maduración linfóide normal. En el linfoma folicular los centrocitos suelen predominar sobre centroblastos, y suelen tener un

## INTRODUCCIÓN

comportamiento indolente. La preservación de la arquitectura del centro germinal y la proporción de centrocitos y centroblastos dará la gradación histológica del linfoma folicular.

Las células B que han pasado por el centro germinal, convertidas en células B de memoria, pasan a la sangre y forman parte de la zona marginal de los folículos linfoides de los ganglios linfáticos, el bazo y también de tejidos linfoides asociados a mucosa (MALT). **Los linfocitos B de las zonas marginales** mencionadas, normalmente expresan antígenos pan-B, IgM de superficie con bajo nivel de expresión y también IgD, y carecen tanto CD5 como de CD10<sup>26</sup>. Mientras que las células plasmáticas contienen IgG o IgA, carecen de sIg y CD20, y expresan MUM1, CD79a, CD38 y CD138.

Es interesante que las células B que han pasado por el centro germinal (post-centro germinal) conservan la capacidad de volver a los mismos tejidos en los que se sometieron a la estimulación antigénica, probablemente a través de la integrinas de superficie, de modo que las células B que maduraron en tejidos linfoides asociados a mucosas tienden a volver aquí, mientras que las que surgieron de ganglios linfáticos volverán a los ganglios y a la médula ósea. **Los linfomas de la zona marginal, bien sean linfomas tipo MALT, esplénicos de la zona marginal, o marginales nodales** se originan de células B post-centro germinal, o linfocitos B de memoria de la zona marginal, que se desarrollan y proliferan específicamente en cada una de las mencionadas regiones (extranodal, bazo o ganglios linfáticos).

## INTRODUCCIÓN

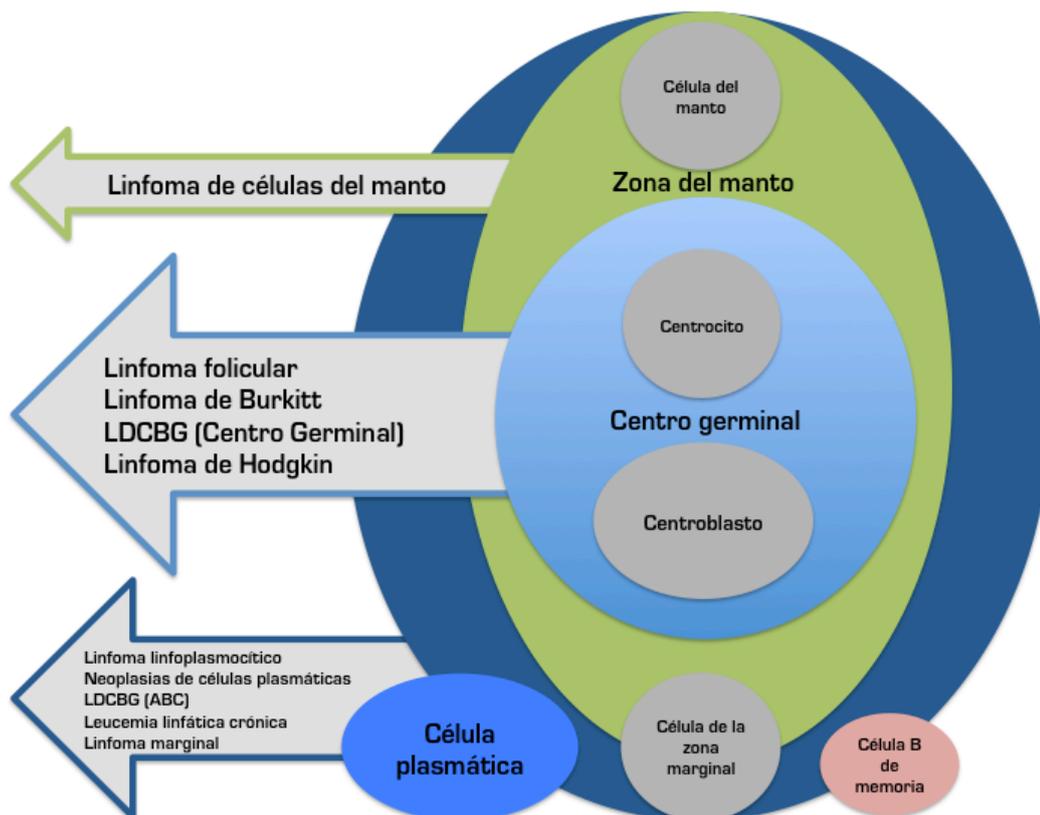


Figura 3. Imagen adaptada del libro ESMO (Capítulo 3, Carvajal y Campo). LDCBG: Linfoma difuso de células B grandes

### 1.1.3. Clasificación de la OMS de las neoplasias linfoides

La clasificación de la Organización Mundial de la Salud de las neoplasias linfoides se actualizó por última vez en 2008 y representa un consenso mundial sobre el diagnóstico de estos tumores utilizando un enfoque multidisciplinario. Algunas cuestiones persisten sin resolver, como definir en qué grado las alteraciones genéticas o moleculares específicas definen ciertos tumores, y aún queda un largo recorrido para poder clasificar correctamente las entidades provisionales.

De forma general, las enfermedades, en esta clasificación se estratifican según su origen celular y, del estadio madurativo (precursor, maduro) de la célula tumoral de la que se origina el tumor. Los principios de la clasificación propuesta en 2001 se basaron en la Clasificación Revisada Europea-Americana de Neoplasias linfoides publicada por el Grupo Internacional de Estudios del linfoma en 1994<sup>27</sup>.

## INTRODUCCIÓN

- Leucemia linfática crónica/ Linfoma linfocítico de célula pequeña
- Leucemia de prolinfocítica de células B
- Linfoma esplénico de zona marginal
- Leucemia de células peludas (Tricoleucemia)
- Leucemia/Linfoma esplénico no clasificable\*
  - Linfoma B esplénico de célula pequeña de la pulpa roja\*
  - Leucemia de células peludas variante
- Linfoma linfoplasmocítico
  - Macroglobulinemia de Waldenström
- Enfermedad de cadenas pesadas
  - Enfermedad de cadenas pesadas  $\alpha$
  - Enfermedad de cadenas pesadas  $\gamma$
  - Enfermedad de cadenas pesadas  $\mu$
- Mieloma de células plasmáticas
- Plasmocitoma solitario del hueso
- Plasmocitoma extraóseo
- Linfoma de células B de zona marginal extranodal de tejido linfoide asociado a mucosas (linfoma MALT)
- Linfoma de célula B de zona marginal nodal
  - Linfoma de zona margina pediátrico\*
- Linfoma de centro folicular cutáneo primario
- Linfoma folicular
  - Linfoma folicular pediátrico\*
- Linfoma de células del manto
- Linfoma B difuso de célula grande, NOS (not otherwise specified)
  - Linfoma difuso B de célula grande rico en células T /histiocitos
  - DLBCL del anciano EBV+\*
  - DLBCL primario cutáneo de la pierna
  - DLBCL primario del sistema nervioso central
  - DLBCL asociado a inflamación crónica
- Granulomatosis linfomatoide
- Linfoma de célula grande B primario mediastínico (tímico)
- Linfoma B de célula grande intravascular
- LDCBG ALK positivo

## INTRODUCCIÓN

- Linfoma plasmablástico
- Linfoma de célula grande asociado a enfermedad de Castleman multicéntrica HHV8
- Linfoma primario de derrame
- Linfoma de Burkitt
- Linfoma de célula B no clasificable con características intermedias entre difuso de célula grande y linfoma de Burkitt
- Linfoma de célula B no clasificable con características intermedias entre difuso de célula grande y linfoma de Hodgkin clásico.



## INTRODUCCIÓN

### 1.2. Análisis clínico y biológico de la transformación de los linfomas B indolentes

#### 1.2.1. Definición de transformación del linfoma B indolente.

Desde hace años se conoce que una parte de los linfomas indolentes pueden recaer o progresar con una histología y comportamiento clínico propios de un linfoma agresivo; habitualmente de histología concordante con un linfoma difuso de células B grandes (LDCBG) y en menor medida con un linfoma con características intermedias entre LDCBG y linfoma de Burkitt<sup>28</sup>. Dicha transformación también se ha estudiado de forma predominante en los linfomas foliculares, aunque también se describe en otros tipo de síndromes linfoproliferativos indolentes, como la leucemia linfática crónica (LLC), el linfoma de tejido linfoide asociado a mucosas (MALT)<sup>29</sup> el linfoma linfoplasmocítico (LPL) o linfoma de Hodgkin predominio linfocítico nodular (LH-PLN)<sup>30</sup>.

El diagnóstico histológico se considera el gold-standard, y siempre que sea posible, la sospecha de transformación debe intentar documentarse mediante el diagnóstico anatomopatológico de la biopsia tisular. El LDCBG resultante mantiene con frecuencia un patrón de CG , pero con células grandes infiltrando los ganglios linfáticos de forma difusa y borrando la estructura folicular.

Aunque este es el modelo más intuitivo y generalizado de proceso de transformación de los linfomas indolentes, sabemos que existen otros patrones de evolución histológica y clínica de los síndromes linfoproliferativos que no se ajustan a este modelo clínico "lineal", de linfoma indolente que adquiere características de agresividad; sin embargo, su relativa infrecuencia, su significado biológico está menos establecido.

En este grupo heterogéneo cabría mencionar 3 grupos que, a continuación, nombraremos y posteriormente definiremos: linfomas composite; linfomas diagnosticados en fase agresiva que recaen o progresan en forma de linfoma indolente y que se han llamado en determinadas revisiones linfomas "downgrading" o "downgraded"; y linfomas que presentan afectación de alto grado en la adenopatía e infiltración de bajo grado en MO u otras localizaciones, histología que es "discordante" con el alto grado, y por tanto, "lifomas discordantes" es el nombre con que se conoce este tercer grupo de linfomas agresivos.

## INTRODUCCIÓN

### *Linfoma composite.*

El concepto anatomopatológico de linfoma “composite”, o compuesto, hace referencia a la coexistencia en una misma pieza tumoral de diferentes histologías que pueden estar relacionadas clonalmente, es decir, tener un supuesto origen común, o no. Y de hecho, se han reportado casos que demuestran que son posibles ambas situaciones<sup>31,32</sup>. Gracias a las técnicas de microdissección, se ha podido establecer el perfil de expresión genética y mutacional de las distintas poblaciones de estos linfomas de histología compuesta.

Cuando en una misma pieza tumoral se diagnostican de forma simultánea un linfoma indolente y un linfoma agresivo, y se llega a la demostración de que ambas histologías tienen un mismo origen clonal, se postula que se trata de un proceso de transformación precoz<sup>33</sup>. Sin embargo, algunos autores consideran que deben de pasar al menos 6 meses entre la documentación de ambas histologías para hablar de verdadera transformación<sup>34</sup>.

### *Linfomas “downgraded”*

Ya en 1989, algunos grupos de patólogos comenzaron a observar que algunos linfomas agresivos podían recaer como linfomas indolentes años después del diagnóstico y al revisar las muestras del diagnóstico, en algunos se podían documentar restos del clon indolente<sup>35</sup>. Se describió entonces que la mayor quimiosensibilidad del clon más proliferativo (el agresivo) podría favorecer una recaída del clon tumoral más indolente. Desde entonces, los profesionales dedicados al estudio y tratamiento de esta patología han observado este evento de transformación “inversa”, observado muy ocasionalmente en la práctica clínica diaria.

De un modo análogo a lo descrito en el subgrupo previo de linfomas “composite”, aún no se han definido genéticamente estos casos tan excepcionales, pero probablemente su perfil biológico nos acabe dando la clave para entender qué analogías o discrepancias existen con los otros grupos de transformaciones.

### *Linfomas agresivos con histología discordante (de bajo grado) en la médula ósea*

Los linfomas discordantes son aquellos en los que aparecen dos subtipos histológicos diferentes de linfoma simultáneamente en el mismo paciente, y en dos o más localizaciones separadas<sup>36</sup>. La discordancia, por lo general, implica un linfoma de bajo grado en un sitio anatómico y un linfoma de alto grado en otros lugares. Un tipo común de discordancia se observa en pacientes con un diagnóstico primario de linfoma difuso de células B grandes (LDCBG) con afectación médula ósea por una lesión de grado inferior<sup>37</sup>. Aunque inicialmente se describió que la afectación de la MO por linfoma de histología discordante de bajo grado tenía un pronóstico similar a los pacientes con ausencia de infiltración de la MO, mientras que la afectación por linfoma de alto grado estaba asociado con una clara disminución de la supervivencia global, los escasos datos que se han aportado posteriormente<sup>38</sup> no apoyan esta teoría sino que en algunos estudios plantean que este grupo podría presentar un patrón de supervivencia intermedio entre los linfomas sin afectación de la MO y aquellos con afectación por el linfoma agresivo. En cualquier caso, la biología de estos linfomas sigue siendo desconocida. Por un lado, la baja infiltración de la MO dificulta el análisis molecular del tumor de esta localización, y la dificultad de la separación celular en la MO contribuye a que sea aún más difícil. En cualquier caso, se han publicado muy pocos datos de las características biológicas de esta discordancia histológica<sup>39</sup>.

La citometría de flujo, la citomorfología y por supuesto las técnicas genéticas y moleculares podrían ayudar a desglosar este grupo de pacientes y comprender mejor su comportamiento biológico.

#### **1.2.2. Epidemiología y estado actual**

La incidencia de la transformación agresiva de los SLP indolentes no está bien establecida, principalmente por el empleo de diferentes criterios para definir y clasificar la transformación (criterios histológicos frente a criterios clínicos), el tamaño muestral o el tiempo de seguimiento de los estudios, entre otras causas<sup>40</sup>. Además, en la mayoría de trabajos no se realizan estudios de clonalidad que permitan identificar si el linfoma agresivo corresponde al mismo clon y por tanto

## INTRODUCCIÓN

puede demostrarse una identidad clonal de ambos linfomas descartando que se trate de un linfoma nuevo, agresivo.

Los estudios realizados en los últimos 30 años han sido, en su mayoría, desarrollados antes de la introducción de los tratamientos basados en la combinación de inmunoterapia (agentes monoclonales) con quimioterapia convencional que cambiaron de forma drástica la supervivencia de los síndromes linfoproliferativos, entre ellos el linfoma folicular<sup>41</sup>. Con estos estudios, el riesgo estimado de transformación se estableció en torno a un 3% al año en el linfoma folicular, que dada su mayor frecuencia ha sido el linfoma indolente más estudiado en este aspecto<sup>42</sup>.

En otros síndromes linfoproliferativos como la **leucemia linfática o linfoide crónica** (LLC), enfermedad en la que cada vez se avanza más en los mecanismos que integran su proceso evolutivo, se observa también el fenómeno de transformación. La LLC puede mostrar un aumento de tamaño de célula y actividad proliferativa y puede acompañarse de la confluencia de los centros proliferativos en los ganglios linfáticos y/o en la médula ósea; este fenómeno suele acompañarse de un aumento de los prolinfocitos en la sangre periférica. Sin embargo, la progresión a una verdadera leucemia prolinfocítica B es muy poco frecuente. Más frecuente es el desarrollo de LDCBG en un paciente diagnosticado de LLC (proceso que se conoce como Síndrome de Richter), que sufren hasta un 2-8 % de los pacientes; también se ha descrito el desarrollo de linfoma de Hodgkin clásico hasta en un 1 % de los pacientes con LLC<sup>43</sup>. La supervivencia mediana para los pacientes que sufren un Síndrome de Richter es menor de un año.

También se observa transformación en el **linfoma esplénico de la zona marginal**<sup>44</sup>. En el caso de los **linfomas linfoplasmocíticos (LLP)**, y las macroglobulinemias de Waldenström (LLP con infiltración de MO y detección en suero de componente monoclonal IgM), se han descrito que los casos con aumento de inmunoblastos (células transformadas) en la histología se asociarían a un peor pronóstico; sin embargo, se desconoce la relación cuantitativa del porcentaje de inmunoblastos con el pronóstico. La transformación a LDCBG, sólo ha sido observada en una pequeña proporción de los pacientes, asociándose a un pronóstico infausto<sup>45</sup>.

### **1.2.3. Transformación del linfoma folicular**

#### **1.2.3.1. Incidencia de transformación del linfoma folicular**

La incidencia acumulada de transformación tras la introducción de la inmunoterapia no se conoce con exactitud, aunque como se ha dicho, es la transformación más frecuentemente observada de linfomas indolentes, y afecta a un 1-3% de los linfomas foliculares anualmente. Las discrepancias entre grupos residen en la ausencia de criterios unificados y validados para definir la transformación. Esta heterogeneidad en el diagnóstico de la transformación (con distintas proporciones de sospechas clínicas y confirmaciones histológicas entre estudios) hace que sea imposible conocer, de forma definitiva, la incidencia real de verdaderas transformaciones combinando los estudios entre sí. La mayor dificultad es la obtención de una confirmación histológica en todos los casos, y se basa en la falta de accesibilidad, en muchos casos, al emplazamiento tumoral que se considera idóneo para poder obtener una muestra rentable. Es posible, que en un futuro próximo, la detección en sangre periférica del ADN de las células tumorales y las nuevas técnicas de secuenciación de nueva generación, solventen esta dificultad.

#### **1.2.3.2. Criterios clínicos de transformación**

En la práctica clínica diaria, la evolución de los síndromes linfoproliferativos se acompaña de manifestaciones clínicas. Es relativamente frecuente que se sospeche una evolución agresiva de la enfermedad, y la demostración histológica de este evento, como hemos apuntado, no es siempre factible con las técnicas disponibles en la práctica clínica hoy en día<sup>46</sup>. También sabemos que durante la evolución de la transformación podemos encontrar en un mismo paciente zonas que han sufrido transformación, mientras que en otras regiones, persisten zonas de tumor en fase indolente, coexistiendo ambos estadios evolutivos. No es fácil, al menos no lo ha sido hasta la introducción de las pruebas metabólicas modernas, saber qué región es más activa o proliferativa y más tendente a haber evolucionado histológicamente.

Debido a estas dificultades, algunos grupos que estudian la transformación del linfoma folicular han intentado establecer unos marcadores biológicos y clínicos

## INTRODUCCIÓN

que permitan predecir la transformación cuando la documentación biológica no es posible. Estos grupos, definen la transformación clínica del linfoma folicular en base a cinco criterios:

- Aumento de LDH
- Crecimiento rápido de adenopatías
- Hipercalcemia
- Aparición de nuevas localizaciones extranodales
- Aparición de nuevos síntomas B

Según estos autores<sup>34,46,47</sup>, con el cumplimiento de estos criterios podría aceptarse el diagnóstico de transformación para adoptar las estrategias terapéuticas necesarias.

### 1.2.3.3. Pruebas metabólicas

La inclusión de la tomografía por emisión de positrones (PET) con 18F fluorodeoxiglucosa (FDG) se ha convertido en una herramienta útil en detección de enfermedad en LNH<sup>48</sup>.

La PET puede ayudar en el diagnóstico de la transformación histológica, dado que un valor de captación estándar (SUV) elevado se correlaciona con histologías más agresivas. Existen distintos estudios que apuntan a que un valor elevado del SUV pueden ayudar a predecir una zona o área de transformación. Así, valores de SUV>13 podrían predecir un linfoma agresivo en el 90% de los casos<sup>49</sup>.

Además, esta herramienta puede ser útil para seleccionar la adenopatía que debe biopsiarse para confirmar la transformación. A diferencia de lo que sucede en el LBDCG, el valor del PET para la evaluación de la respuesta al tratamiento en el linfoma transformado no ha sido aún determinado y deberá ser establecido en estudios prospectivos

Se ha estudiado la rentabilidad de la biopsia guiada por PET. Se ha visto que el SUV medio en los sitios diagnósticos de LFt varía entre 3 y 28.

En uno de los estudios más recientes<sup>50</sup> se estudió el SUV de los pacientes con sospecha clínica de LF transformado. De un total de 38 sospechas, se confirmó la transformación histológicamente en 17. De estos, un SUV máx superior a 17 en la PET pre-biopsia tuvo un valor predictivo del positivo del 100%. Mientras que un SUV inferior al 11.7 se asoció con una baja incidencia de transformación

histológicamente documentada.

A la vista de estos resultados, y debido a la falta de datos que indiquen una determinada estrategia diagnóstica para detectar la transformación, los autores concluyen que la PET no reemplaza en este momento a la biopsia como el gold-standard para confirmar una transformación. Sin embargo, en circunstancias muy concretas donde aparezca un SUV >17 en un paciente con una biopsia inaccesible y un curso clínico compatible, podría valorarse el tratar al paciente bajo una sospecha de transformación con un tratamiento acorde a la misma.

### **1.2.3.4. Perspectiva biológica**

En este apartado, nos centraremos inicialmente en las características biológicas del proceso evolutivo del linfoma folicular, debido a su frecuencia y describiremos los avances más relevantes que han surgido recientemente.

En un segundo apartado, se revisará brevemente las características clínicas y biológicas de la evolución y transformación de otros linfomas indolentes.

#### ***Origen del linfoma folicular transformado***

El término de "transformación de alto grado" que utilizamos habitualmente puede resultar algo impreciso, a la luz de los conocimientos actuales<sup>51</sup>. La propia historia natural del LF, si nos situamos desde su comienzo (en la célula precursora tumoral), se basa en transformaciones sucesivas, que convierten una célula precursora en otra con mayor potencial maligno y con un comportamiento clínico diferente. De hecho, un evento habitual en individuos sanos, que es la translocación del gen *BCL2* con el promotor del gen *IGH*, no es la causa de que la célula B sana se transforme hacia un clon de LF. Es la acumulación posterior de mutaciones la que favorece esta conversión, y se cree que estas mutaciones acumulativas ocurren a través de la actividad "colateral" de la "activation induced desaminase" (desaminasa inducida por activación) (AID)<sup>52</sup>, que actúa de forma habitual en los centros germinales (CG) de los ganglios linfáticos y que tiene como función la hipermutación somática (HMS) de la región variable de las cadenas de las inmunoglobulinas. Sin embargo, a veces la enzima actúa sobre otras zonas del genoma que no son su objetivo, produciendo lo que se conoce como HMS

## INTRODUCCIÓN

aberrante (HMSA), que podría ser en parte responsable de la tumorigénesis de aquellas neoplasias linfoides originadas a partir de célula folicular B.

El término "transformación" del LF implicaría que la propia célula tumoral que conforma el linfoma folicular se modifica y adquiere un carácter agresivo. Este patrón de evolución "lineal", es decir de célula precursora tumoral a linfoma folicular y de éste a linfoma agresivo es, sin embargo, el menos frecuente según han puesto de manifiesto algunos estudios de filogenia del proceso de transformación. De hecho, se ha encontrado con más frecuencia un patrón "no lineal" en el que el clon detectado en la transformación está más estrechamente relacionado con la célula precursora tumoral que con el clon de linfoma folicular detectado en la fase indolente.<sup>53-56</sup>

### *Patrones de evolución del linfoma folicular*

En relación a estos hallazgos, se han propuesto varios modelos de desarrollo evolutivo de los clones tumorales en el linfoma folicular.<sup>53-57</sup>

- **Patrón de evolución "no evolutivo"** No se observa un patrón de evolución, sino que las secuencias del tumor primario y en las recaídas se alternan sin observarse una relación evolutiva.
- **Patrón de evolución lineal o secuencial** Se observa que el tumor en la recaída proviene del tumor primario. Cada momento evolutivo incluye las mutaciones adquiridas en la recaída anterior
- **Patrón de evolución divergente** Explica la existencia de una célula progenitora común (tumoral) que adquiere ciertas mutaciones dando lugar al clon del LF, mientras que adquiere otras de forma paralela y en un momento de la evolución de este paciente se manifiesta el clon del linfoma agresivo, que sin estar relacionado directamente con el linfoma folicular, comparte un mismo precursor común.

## INTRODUCCIÓN

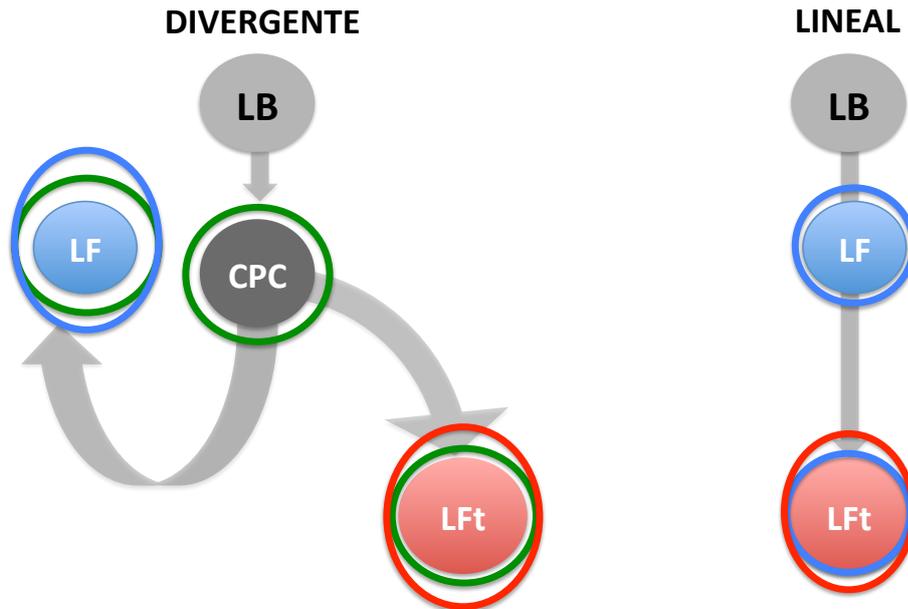


Figura 3. Esquema de los diferentes patrones de evolución de la célula B (LB) hasta convertirse en linfoma folicular (LF) y/o linfoma folicular transformado (LFt). El modelo lineal, implica la adquisición secuencial de mutaciones, que aparecerán en última instancia en el LFt. El modelo divergente, sin embargo, parte de la hipótesis de una célula precursora común (CPC) que originará dos subclones, del que se originarían respectivamente el LF y el LFt. La presentación de estas entidades, por lo tanto, no tendría por qué ser secuencial sino que podrían manifestar diferentes comportamientos en cuanto al momento de aparición de cualquiera de los dos subtipos histológicos.

En el trabajo de Jessica Okosoun<sup>53</sup>, en el que se estudiaron 10 muestras pareadas de LF y LFt (4 con whole exome sequencing o WES y 6 con whole genome sequencing o WGS), predominó el modelo de evolución divergente. Se observaron dos patrones de evolución desde la CPC. En el primero, observado en 8 casos, existían numerosos genes comúnmente afectados en el LF y LFt, sugerente de la existencia de un clon precursor común (CPC). Entre los genes observados, destacaron los reguladores de histonas, como *MLL2* (una histona metil-transferasa) y otros como *CREBBP*, *EP300*, *EZH2* y *MEF2B*, ya descritos previamente<sup>58,59</sup>. Además, se observó la implicación de genes implicados en la inmunomodulación como *B2M*, *CD58* y *TNFRS14*, la vía JAK-STAT y la del receptor de la célula B (BCR) y la vía de señalización NF-KB (con los genes *BCL10*, *CARD11* y *CD79B*), de conocido papel en la linfomagénesis<sup>60,61</sup>. El segundo patrón lo constituyeron 2 pacientes en los que apenas se compartieron mutaciones (solamente 4 mutaciones no sinónimas) entre los clones de LF y LFt.

## INTRODUCCIÓN

Además de este número tan bajo de mutaciones comunes, llamó la atención la implicación común de 3 genes *MLL2*, *TNFRS14* y *CREBBP*, pero con mutaciones en diferente posición en cada una de las fases evolutivas. Este hecho, sirvió para definir un nuevo patrón “convergente” de evolución. Es decir, la implicación de distintos mecanismos para conseguir herramientas comunes necesarias para desarrollar linfomas.

### ***Las mutaciones “driver” o conductoras de la transformación histológica***

No existe un mecanismo de transformación de LF a LDCBG único a la luz de la complejidad de los patrones evolutivos. Sin embargo, parecen reconocerse algunos mecanismos implicados en la transformación: la alteración de los puntos de control del ciclo celular (a través de la mutación o delección de quinasa dependiente de ciclina 2A/B -*CDKN2A/B*- y alteraciones en *CMYC*); la afectación de los mecanismos de respuesta al daño del ADN, como la pérdida del gen supresor tumoral *TP53*, y otros mecanismos diversos como las mutaciones en el gen *EBF1* y la afectación de genes implicados en la vía de proliferación celular *NFKB* como *MYD88* y *TNFAIP3*<sup>53</sup>. Además, intervienen pérdidas de genes asociados con la regulación de la respuesta inmune. Uno de estos sistemas de regulación es el sistema del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) y los antígenos que lo integran (HLA) de clase 1; la desregulación se produce a través de mutaciones específicas en el gen de la  $\beta$ -2-microglobulina (que es un componente crítico del complejo HLA de clase 1), y otras que afectan a CD58 (que participa en la regulación de los daños celulares mediados por el sistema del complemento)<sup>55,61</sup>. Estos mecanismos puede aparecer sobre un subclón anterior en la secuencia evolutiva o bien desde una célula progenitora común.

En general, el perfil de mutaciones identificadas en el LF transformado se asemeja a las alteraciones características del LDCBG tipo centro germinal (GCB), que como se identificó comparten el perfil de expresión genético de las células B de los centros germinales<sup>62,63</sup>. Sin embargo, también comparte algunas de las características genéticas y epigenéticas que definen a los LDCBG tipo célula B activada (ABC), y que se denominan así por compartir el perfil de expresión génica observado en las células B de sangre periférica durante su activación in vitro<sup>62</sup>.

## INTRODUCCIÓN

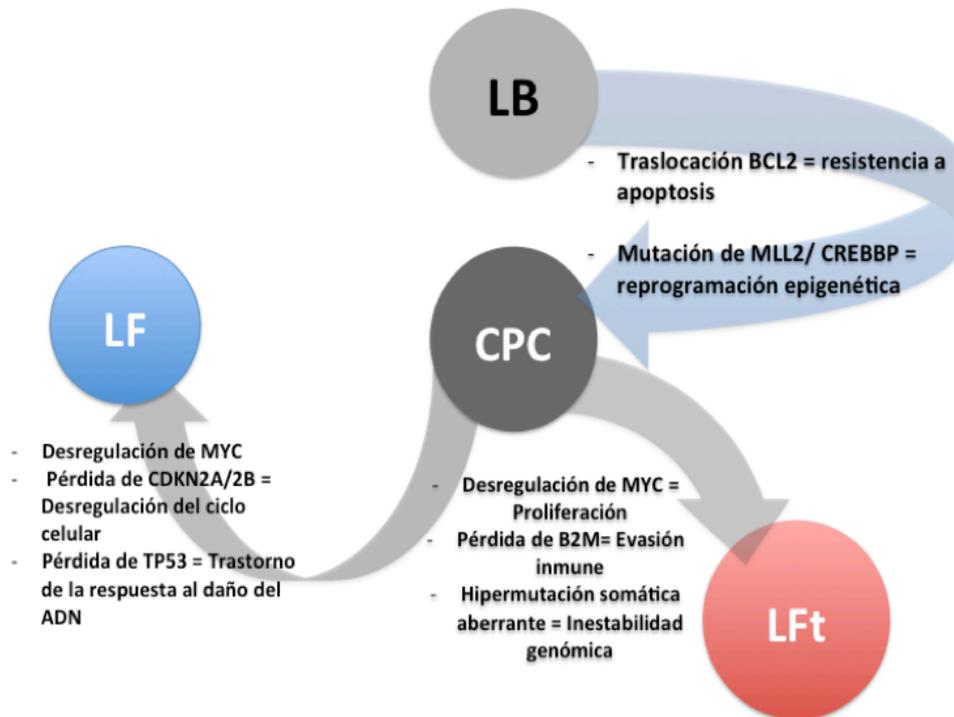


Figura 4. Adaptada de Pasqualucci, Dalla-Favera et al. Genetics of Follicular Lymphoma Transformation, 2014 (Cell). Se representan los eventos transformantes de la célula B (LB) para evolucionar a célula precursora común (CPC) que posteriormente adquirirá los mecanismos genéticos correspondientes para derivar en un Linfoma Follicular (LF) o en un Linfoma Follicular transformado (LFt).

### ***Mecanismos epigenéticos implicados en la transformación***

El grupo de la Universidad de Columbia,<sup>54</sup> describió las mutaciones comunes y específicas de fase de un grupo de 12 pacientes con muestras correspondientes al diagnóstico y transformación del linfoma follicular. Mediante secuenciación del exoma completo de estos pacientes, llegaron a la conclusión de que las lesiones que aparecen de forma temprana en el LF, y que contribuyen a su patogénesis, afectan principalmente a reguladores epigenéticos (genes que controlan la estructura de la cromatina) como pueden ser *MLL2* (más formalmente conocido como *KMTD*), *EZH2* ó *EP300* y *CREBBP*, cuya afectación se asocia a aberraciones genéticas que implican a genes importantes en la linfomagénesis como son *TP53* y *BLC6*<sup>54,64</sup>. Sugieren que estas mutaciones podrían ser las “instigadoras” a la

## INTRODUCCIÓN

adquisición de un fenotipo "mutador", ya que esta modificación tridimensional de la estructura de la cromatina, podría permitir el acceso de la AID a regiones inapropiadas del genoma, conllevando a la HMSA y con ello favorecerían una inestabilidad genética capaz de conducir la transformación adicional.

De esta manera, la desregulación epigenética podría ser clave para el desarrollo de la transformación histológica, pero no es directamente responsable del mantenimiento de un fenotipo agresivo.

EL grupo alemán de la Universidad de Leipzig<sup>57</sup>, comparó muestras de LF al diagnóstico y en diferentes progresiones (sin estudiar las transformaciones) y para ello se basó en la secuenciación de los genes *IGHV*, describiendo la evolución de su estado mutacional. Integraron los resultados con el estudio del patrón de metilación del genoma completo del linfoma folicular en sus distintos momentos evolutivos, cuantificado con técnicas de genotipado masivo. Para establecer el punto de corte para considerar un patrón de evolución divergente, se compararon la variabilidad de metilación de los diversos pacientes a lo largo de su evolución (comparando la proporción de bases metiladas sobre el total de islas CpG de cada paciente) y así, aquellos casos con más de un 25% de variabilidad se consideraron evoluciones divergente. La divergencia epigenética se correlacionó con la evolución genética (HMS de los genes *IGHV*). De modo general, las muestras en la recaída o progresión del linfoma folicular, mostraron un mayor porcentaje de metilación de islas CpG que las muestras al diagnóstico. No existen datos hasta la fecha focalizados en el patrón de metilación de los linfomas transformados, ni de su comparación con otros linfomas agresivos.

### **1.2.4. Otros linfomas indolentes y su proceso de transformación**

#### **1.2.4.1. Leucemia linfática crónica. Desarrollo de Síndrome de Richter**

##### ***Síndrome de Richter***

El síndrome de Richter (SR) se define como el desarrollo de un linfoma, habitualmente de histología compatible con linfoma difuso de células B (DLBCL), que se origina durante la evolución de la leucemia linfocítica o linfática crónica B.<sup>65</sup>

## INTRODUCCIÓN

El 2,8% de los pacientes con LLC desarrollan un LDCBG, siendo la incidencia acumulada de transformación de LLC a SR durante la historia natural de la LLC del 10% aproximadamente. Además, <1% desarrollan un linfoma de Hodgkin de histología clásica<sup>43</sup>. La mediana de supervivencia para los pacientes con SR es de menos de un año. El LDCBG desarrollado en el contexto evolutivo de una LLC, suele denominarse SR cuando el LDCBG deriva de la misma célula B que originó el clon LLC, comprobando la identidad clonal de ambos tumores. Sin embargo, también se denomina SR al linfoma que aparece en el contexto de una LLC activa, sin estar relacionado clonalmente con la LLC. Mientras que la identidad clonal entre ambos tumores es mucho más frecuente en las LLC no mutadas, de peor pronóstico, los LDCBG con diferente reordenamiento de *IGH* y por tanto distinto origen clonal, aparecen en el contexto de LLC mutadas, de mejor pronóstico.<sup>66</sup> De hecho, los SR en los que se demuestra la identidad clonal con el clon de la LLC poseen un pronóstico muy desfavorable, ya que la mayoría de los pacientes no responden a la terapia estándar diseñada para los LDCBG<sup>67, 68</sup>.

### *Evolución clonal de la LLC y su proceso de transformación*

El perfil mutacional de la CLL es complejo y poco uniforme. Se caracteriza por una elevada heterogeneidad genética y epigenética, con una baja tasa de recurrencia de las mutaciones y una larga cola de genes implicados, sin una buena definición de los genes conductores de la progresión tumoral<sup>69</sup>.

Los estudios que han empezado a utilizar la secuenciación con alta profundidad, han permitido llegar a concretar en qué orden se adquieren algunas de las mutaciones más recurrentes, llegando a precisar el número de células cancerosas que poseen cada mutación en los diferentes estadios evolutivos. Los trabajos más recientes<sup>70-72</sup> permiten definir dos tipos de mutaciones: mutaciones clonales, que están presentes en todas las células tumorales y representan los primeros eventos en el proceso de la transformación tumoral de la célula precursora y las mutaciones subclonales, generalmente presentes en una pequeña población de las células leucémicas y que representarían eventos tardíos en la LLC.

En el trabajo de Landau *et al.*<sup>72</sup> definieron tres períodos en la historia de la enfermedad, basados en la evolución del genoma. El primer período de pre-

## INTRODUCCIÓN

transformación que está basado en la acumulación, dependiente de la edad, de mutaciones clonales en una célula que con el tiempo originará la LLC. La siguiente etapa está definida por un evento transformador, que convierte en maligna a la célula B fundadora de la LLC. El tercero y último periodo se caracteriza por la expansión de mutaciones subclonales en respuesta a diversos estímulos. Las primeras, serían más selectivas del programa genético de las células B, mientras que las mutaciones responsables de la progresión o mantenimiento de la LLC apuntarían a genes conductores de cáncer más comunes, implicados en diferentes tumores. La variabilidad entre los genes encontrados en los diferentes estudios y su diferente proporción podría estar basada, teniendo en cuenta el potencial papel del microambiente y los estímulos externos (tratamientos y número de líneas recibidas en las series disponibles).

Gracias al estudio de exomas y/o genomas de la LLC se han obtenido respuestas acerca de la evolución clonal de esta enfermedad hacia SR y se han desvelado parte de los eventos implicados en la aparición de la enfermedad, incluyéndose algunos localizados en regiones no codificantes<sup>73</sup>. Y en el desarrollo posterior de transformaciones agresivas, y por ejemplo, el grupo de la Universidad de Columbia<sup>74</sup> ha demostrado que aunque la tendencia evolutiva de la LLC para convertirse en SR se basa en la adquisición lineal de mutaciones, en los casos en los que los clones de linfoma agresivo se encuentran en la sangre periférica (leucemizados), es más frecuente (2/3) una evolución divergente o ramificada branching a partir de una célula precursora tumoral.

### ***Genes implicados y mutaciones “driver” en el desarrollo del Síndrome de Richter***

La patogénesis molecular de del desarrollo del SR se ha comenzado a conocer más a fondo gracias a las técnicas de análisis molecular que han surgido durante los últimos años. Se ha demostrado que la inactivación del gen supresor de tumores *TP53* se observa en ~ 60% de los pacientes y que constituye en sí mismo un factor pronóstico independiente para la supervivencia global después de la transformación<sup>68</sup>. Otras lesiones genéticas muy frecuentes son las que afectan a los genes *NOTCH1*<sup>75</sup> y las que llevan a la activación de *MYC*;<sup>68,74</sup> éstas aparecen en aproximadamente un 30% de los casos. Como se ha explicado en la patogenia de la transformación de los linfomas foliculares, o como se ha descrito en los linfomas

## INTRODUCCIÓN

del manto<sup>76,77</sup> y en general en la transformación de las neoplasias B indolentes, los eventos genéticos que conducen a la activación de *MYC* coexisten con la disregulación de *TP53*<sup>78</sup>. Se ha demostrado cómo en la LLC la porción intranuclear de *NOTCH1* puede translocarse al núcleo donde activa a genes, entre los que está el propio *MYC*<sup>74</sup>. La interrelación entre estos dos genes se ha estudiado en modelos de leucemia linfoblástica T, donde parece que el propio *NOTCH1* es un activador de la transcripción directa de la expresión del gen *CMYC*<sup>79</sup> y más recientemente se han descrito mecanismos por los que *NOTCH1* actúa sobre *enhancers*, o regiones, de la transcripción del gen *CMYC*<sup>80</sup>.

### ***Aspectos epigenéticos de la evolución de la LLC y el desarrollo de SR***

En los últimos años comienza a cobrar interés el campo de las modificaciones de la estructura del ADN. El uso de la secuenciación de todo el genoma con bisulfito (WGBS) y su integración con el empleo de microarrays de expresión de alta densidad han proporcionado el análisis más amplio del metiloma de la LLC y han permitido comenzar a comprender el papel de la metilación en la expresión de genes implicados en la progresión tumoral. El primero de los grandes estudios sobre metilación del genoma de la LLC<sup>81</sup> definió un perfil global de hipometilación del genoma de la LLC. En este estudio, se comenzaron a discernir perfiles de metilación entre las LLC mutadas y no mutadas, de una forma análoga a las diferencias encontradas entre las células B vírgenes o “naïve” y las células B de memoria.

Dentro del Consorcio Internacional del Genoma de Cáncer<sup>82</sup>, España lideró el estudio detallado del genoma (y epigenoma) de la LLC. Gracias a estos estudios hemos conocido<sup>83</sup>, tras el análisis de la metilación del genoma de 211 pacientes, el perfil epigenético de esta enfermedad. Se han identificado 5 islas CpG, pertenecientes a los genes *B3GNTL1*, *CTBP2*, *SCARF1*, *TNF* y una región intragénica, que permitieron definir tres perfiles de metilación que definían tres grupos clínico-biológicos de LLC: La LLC con perfil de célula B virgen o “naïve”, LLC con perfil de célula B de memoria y LLC con perfil intermedio. Cada uno de estos perfiles se correlacionó a su vez con una selección particular de los genes de la región variable de la cadena pesada de inmunoglobulinas (*IGHV*) en el proceso de reordenamiento de los mismos. *VH1-69* se relacionó con el grupo con fenotipo

## INTRODUCCIÓN

similar a célula B virgen, *VH4-34* con el grupo de características biológicas semejantes a la célula B de memoria y *VH3-23* y *VH1-18* con el grupo intermedio. De la misma manera, el primer grupo mostró un perfil de célula B no mutada (los genes de inmunoglobulinas no había adquirido mutaciones somáticas tras el reordenamiento de los genes, mostrando una homología con la línea germinal superior al 99,7%), el segundo mostraba una tendencia a la mutación de los genes *IGHV* (menos del 92% de homología) y el grupo intermedio mostró un estado mutacional intermedio (96% de homología). El gen *NOTCH1* apareció mutado con más frecuencia en el primer grupo y el gen *SF3B1* en el grupo intermedio. Al observar la incidencia acumulada de transformación a LDCBG a 10 años, el grupo cuyo perfil de metilación era similar a la célula B virgen tenía una incidencia acumulada de transformación del 18% (4-32) en comparación con un 7% (0-20) para el grupo intermedio y 0 para el grupo con perfil de metilación similar a las células B de memoria.

### 1.2.4.2. Linfoma de la zona marginal

El linfoma esplénico de la zona marginal es un subtipo de linfoma indolente. Su expresión leucémica, como linfoma esplénico de la zona marginal con linfocitos vellosos circulantes<sup>84</sup> puede experimentar también transformación histológica a lo largo de su evolución. La incidencia de transformación en este subtipo de linfomas se ha estimado entre un 13%<sup>29</sup> y un 17%<sup>85</sup>. Y el pronóstico de los pacientes estudiados en estas series, es pobre.

Según el estudio de Dunganwalla *et al*,<sup>85</sup> en una serie de 48 pacientes con LEZM leucemizados, la mediana de tiempo hasta la transformación era de 45 meses de mediana (rango: 6-192), describiéndose casos con transformación histológica documentada en el momento del diagnóstico. La histología documentada ha sido LDCBG, aunque se han publicado casos de transformación a linfoma de Burkitt.

Como datos clínicos, los pacientes que experimentaron transformación tenían, con más frecuencia, expresión adenopática de la enfermedad en el momento del diagnóstico así como componente monoclonal IgM asociado. Todos los pacientes transformados tenían afectación de la médula ósea y esplenomegalia en el momento del diagnóstico. Además, cuando la transformación se producía en

## INTRODUCCIÓN

las adenopatías tumorales la respuesta a la quimioterapia era adecuada, con respuestas prolongadas. Sin embargo, las transformaciones en la médula ósea se asociaron con enfermedad refractaria y pronóstico infausto.

Desde el punto de vista biológico, las deleciones del brazo largo cromosoma 7, observadas en el 40% de los pacientes con esta enfermedad, se asociaron con transformación y comportamiento agresivo, como ya se habría descrito previamente<sup>86</sup>. Las alteraciones de *TP53*, se detectaron en el 30% de los pacientes transformados, relacionándose con el evento transformante como se observa en otros modelos de linfoma indolente<sup>87</sup>.

### 1.2.4.3. Linfoma linfoplasmocítico

La incidencia de transformación del linfoma linfoplasmocítico o macroglobulinemia de Waldenström fue de un 13% en la serie más larga recogida hasta la fecha<sup>45</sup>. No se han identificado patrones genéticos que predigan el riesgo de transformación y los escasos casos documentados de transformación coinciden en una quimiorrefractoriedad acusada en los pacientes, que tienen una supervivencia mediana de 10 meses. Se han documentado casos aislados de transformación a histología de linfoma de Burkitt, con traslocación confirmada (8;14)<sup>88</sup>. En cualquier caso, en todos ellos las características clínicas e histológicas son muy agresivas y es preciso conocer los mecanismos implicados en esta transformación para ofrecer mejores alternativas terapéuticas a este grupo de pacientes.

### 1.2.5. Tratamiento y perspectivas terapéuticas del linfoma folicular transformado.

#### 1.2.5.1. Antecedentes y situación actual. El papel de la inmunquimioterapia

Los estudios clínicos que abordan el tratamiento en la transformación están basados en su mayoría en el proceso de transformación del linfoma folicular. El tratamiento del linfoma folicular transformado (Lft) se basa en el utilizado en el LDCBG de novo, ya que no existen estudios prospectivos centrados en este grupo de pacientes. Con estos esquemas, los pacientes con Lft se han caracterizado por presentar un curso clínico más desfavorable, con una respuesta pobre al tratamiento y una corta supervivencia<sup>28</sup>, por lo general inferior a dos años, claramente inferior a la obtenida en LBDCG de novo<sup>89</sup>, en los que, con R-CHOP

## INTRODUCCIÓN

más del 50% de los pacientes alcanzarán la curación tras la primera línea de tratamiento<sup>90</sup>.

En estudios recientes se ha iniciado el análisis de la influencia de los tratamientos previos en la fase de linfoma indolente (basados en antraciclinas, rituximab, análogos de purina...) en la respuesta que se observa tras la transformación. Y se empieza a tener en cuenta el tratamiento previo con rituximab, que ha originado el concepto de “rituximab naïve”; se plantea que los pacientes que reciben por primera vez rituximab en la etapa de transformación, podrían obtener mayor beneficio que aquellos que ya se han puesto en contacto con el anticuerpo monoclonal durante la fase de linfoma indolente. El objetivo final de estas comparaciones pasa por establecer la comparación entre el LfT y el LDCCG, cuando ambos reciben por primera vez esquemas basados en anti CD20.

### 1.2.5.2. Trasplante de progenitores hematopoyéticos

El uso de las altas dosis de quimioterapia seguidas de trasplante autólogo se asocia con mejoras en la supervivencia en pacientes con LF o LDCCG refractario o en recaída y también en el LfT<sup>91</sup>.

El Grupo de Trasplante de Médula Ósea canadiense (CBMTG) llevó a cabo el mayor estudio hasta la fecha, con 172 pacientes con transformación histológica documentada. Noventa y siete recibieron un trasplante autólogo de progenitores de sangre periférica (TASPE) como consolidación. Las supervivencias global y libre de progresión (SG y SLP) mejoraron en los pacientes transplantados, pero con un bajo grado de mejoría (SG a 5 años 65% con TASPE; 61% con rituximab y quimioterapia; hazard ratio (HR) para el grupo de trasplante de 0,13;  $p < 0,001$ )<sup>92</sup>.

Wirk et al, del Centro Internacional de Investigación de Trasplante de Sangre y Médula Ósea (CIBMTR), estudiaron a 108 pacientes con LfT y tratamiento con TASPE. La SG a los 5 años fue del 50%. Sólo el 28% de los pacientes recibieron rituximab antes del trasplante, como tratamiento de primera línea tras la transformación; de todos modos, en este estudio, el análisis multivariante no mostró ningún impacto del tipo de tratamiento recibido antes del TASPE (con o sin rituximab)<sup>93</sup>.

En el Hospital Princess Margaret, en un estudio de 104 pacientes con LfT, (de los cuáles 50 recibieron TASPE) la SG del grupo fue de 54% a los 3 años<sup>94</sup>.

## INTRODUCCIÓN

En un estudio más pequeño de 18 pacientes con LFt y TASPE, el tratamiento de inducción con rituximab demostró resultados más favorables en comparación con cohortes previas a rituximab, con una SG y SLP a los 2 años de 59% y 82%<sup>95</sup>. En este estudio, además, se evidenció que aquellos que no habían recibido rituximab hasta la transformación (“rituximab naïve”) presentaban mejor respuesta al tratamiento que aquellos con sí lo habían recibido<sup>96</sup>.

En un estudio comparativo de TASPE en LDCBG y LFt se demostró también el aumento de SLP en el LFt, con un comportamiento, con unas supervivencias libre de progresión y global superiores a la del LDCBG con consolidación en 1ª RC. Si bien es cierto, que las características inmunohistoquímicas de ambos grupos no eran comparables, con un % significativamente más elevado de casos con fenotipo CG en el grupo de SLT, aunque en el análisis multivariante, las características inmunohistoquímicas del tumor (célula de origen) no se asociaron con mayor o menor tasa de supervivencia<sup>97</sup>.

En otro estudio prospectivo de LFt en la era rituximab, los pacientes incluidos en el registro del NCCN sometidos a TASPE, mostraron nuevamente resultados superiores a los de la quimioterapia sólo (SG a 2 años del 83%). No obstante, los pacientes más jóvenes no tratados previamente (menores de 60 años) con rituximab, no sometidos a TASPE y tratados con inmunquimioterapia sólo, sin TASPE de consolidación, tuvieron muy buenos resultados con un 80% la SG a 5 años<sup>98</sup>.

El trasplante alogénico en el LFt ha sido menos estudiado. Para las recidivas post TASPE, la terapia de rescate con alogénico puede mejorar los resultados, aunque a expensas de la mortalidad relacionada con el tratamiento (TRM)<sup>99,100</sup>. Varios estudios apuntan que las estrategias con acondicionamientos de intensidad reducida (AIR) tienen mejores resultados<sup>92,100,101</sup>.

En este contexto, se han presentado en Diciembre de 2015, en la última reunión de la Sociedad Americana de Hematología, las recomendaciones para el trasplante autólogo en pacientes con linfoma folicular transformado y que sugieren que debería reservarse para aquellos pacientes jóvenes, con una reserva funcional adecuada y que ya hayan recibido quimioterapia convencional o bien que hayan recibido rituximab + quimioterapia en la etapa de linfoma folicular, y por lo tanto una segunda línea en el momento de la transformación<sup>102</sup>.

## INTRODUCCIÓN

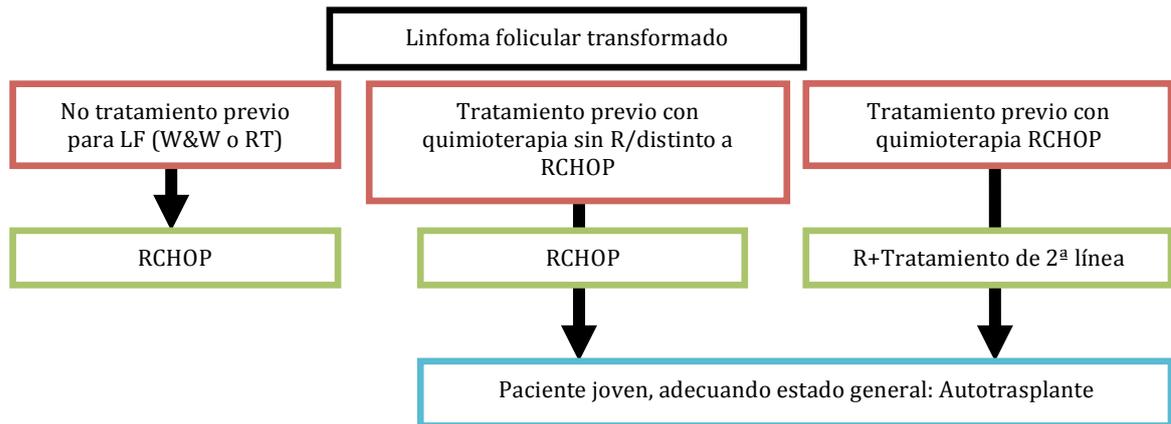


Figura 5. Adaptado de Silvia Montoto<sup>102</sup>. Treatment of patients with transformed lymphoma. ASH annual meeting 2015. Algoritmo terapéutico para el linfoma folicular transformado según la literatura disponible. El trasplante autólogo debería reservarse para aquellos pacientes que recibieron tratamientos previos en la etapa de linfoma folicular

# INTRODUCCIÓN

## 1.2.5.3. Nuevas dianas, nuevos fármacos

La revisión acerca de los mecanismos fisiopatológicos de la transformación, permite identificar las potenciales dianas terapéuticas que a la luz de los conocimientos actuales deberíamos intentar utilizar en el diseño y combinación de nuevos fármacos. Se representarán las vías fisiopatológicas implicadas en la progresión y/o transformación del linfoma folicular identificadas en los estudios disponibles de secuenciación y las potenciales dianas terapéuticas.

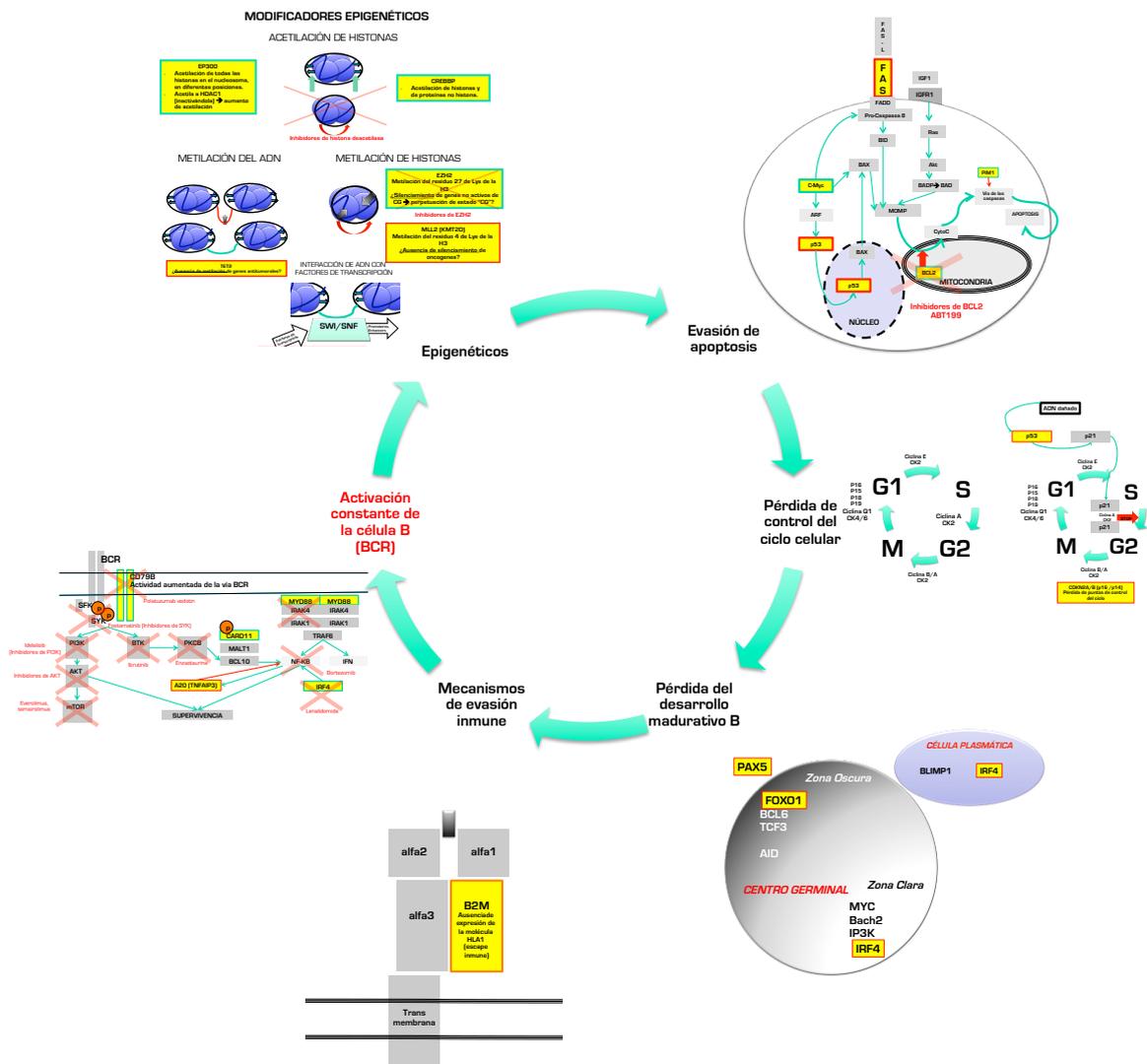


Figura 6. Puntos clave de la transformación del linfoma folicular. Genes afectados (amarillos) y genes con diana terapéutica conocida (aspas rojas). Ilustración original. Bibliografía adaptada principalmente de Pasqualucci *et al*,<sup>54</sup> Okosun *et al*,<sup>53</sup> Hanahan *et al*,<sup>103</sup> Domínguez-Sola *et al*.<sup>104</sup> Las mutaciones activadoras rodean los genes en color verde, y las inactivadoras en rojo.



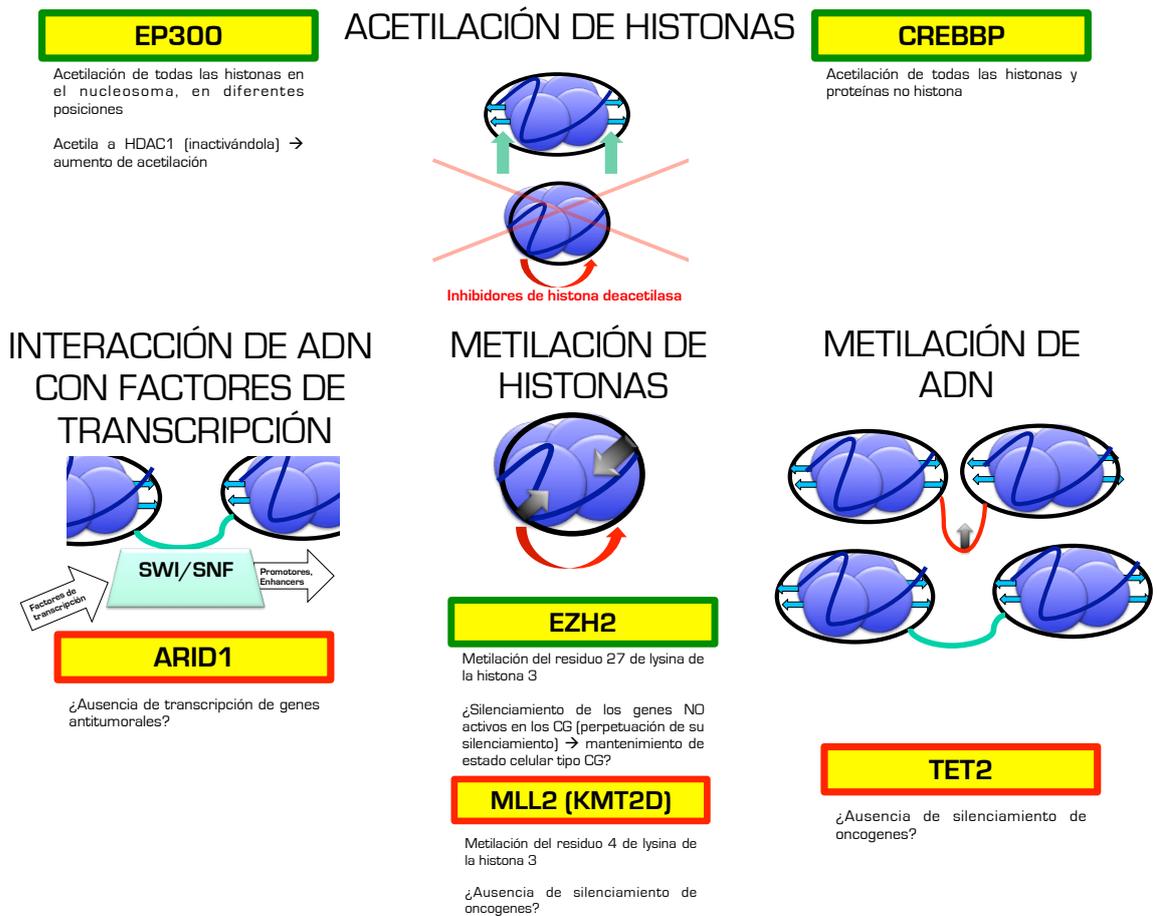


Figura 6.1. La acetilación de las histonas, en líneas generales, separa la doble hélice de ADN, enrollada formando los nucleosomas, de las proteínas tipo histona. Esta separación hace más accesible el contacto de los factores de transcripción con los genes diana. La metilación de las histonas, por el contrario, favorece el empaquetamiento de la estructura nucleosómica, inhibiendo la transcripción. La metilación, en los residuos de citosina de las regiones de islas CpG lleva al silenciamiento de esa región. Un cuarto mecanismo consiste en la interacción del ADN, estructuralmente, con los factores de transcripción. El complejo SWI/SNF participa en esta unión del material genético a factores de transcripción o favorece el contacto de este con enhancers y promotores, mediante mecanismos actualmente en investigación, y en los que la estructura tridimensional del ADN es decisiva y protagonista. Los genes implicados en la modificación epigenética en los estudios de genotipado masivo existentes del linfoma transformado revelan la afectación de estos cuatro mecanismos de modificación estructural del ADN. Disponemos de inhibidores de histona deacetilasa (Vorinostat, Panobinostat) que mantienen las histonas en estado acetilado y con ello al ADN en una conformación más “laxa” y accesible por tanto a los factores de transcripción y otras proteínas reguladoras de la misma. EstáN aprobadoS en los linfomas T cutáneos<sup>105</sup>. Vorinostat se aprobó tras un ensayo fase 2 donde demostró una tasa global de respuestas del 30% en este subtipo de linfoma. Actualmente, se está estudiando su eficacia en regímenes combinados en patología linfoide B.

# INTRODUCCIÓN

## REGULADORES DE LA APOPTOSIS

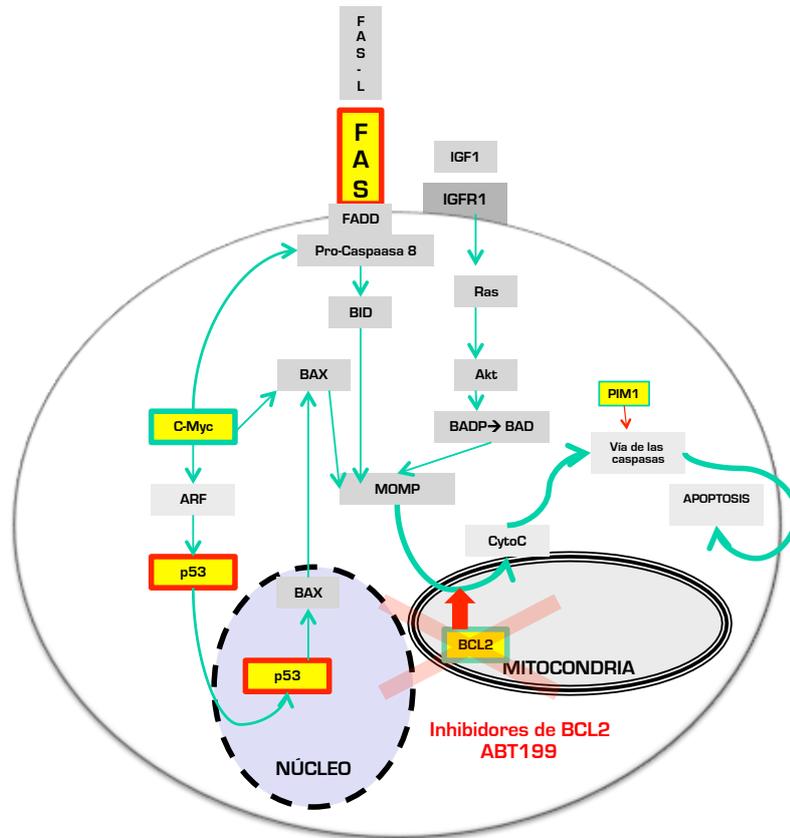


Figura 6.2. La sobreexpresión de BCL2 y CMYC suele atribuirse a ganancias de los genes o traslocaciones que implican yuxtaposición del gen con promotores de genes constitutivamente activos, e implica un pronóstico desfavorable. La supresión de la función de p53, mediante la delección o mutación del gen que la codifica (*TP53*), se asocia también con un pronóstico adverso. Las tres están implicadas en los mecanismos de transformación del linfoma folicular. La inhibición de BCL2 es posible ya gracias al ABT199, Venetoclax, que inhibe la vía antiapoptótica (favoreciendo por tanto la apoptosis) que promueve BCL2. Es capaz por tanto de actuar incluso en tumores con delección o mutación de *TP53* ya que el bloqueo se realiza posteriormente a la actuación de p53 en la vía de apoptosis. Actualmente se están realizando ensayos clínicos para linfoma B utilizando este fármaco<sup>106</sup>.

# INTRODUCCIÓN

## REGULADORES DEL CICLO CELULAR

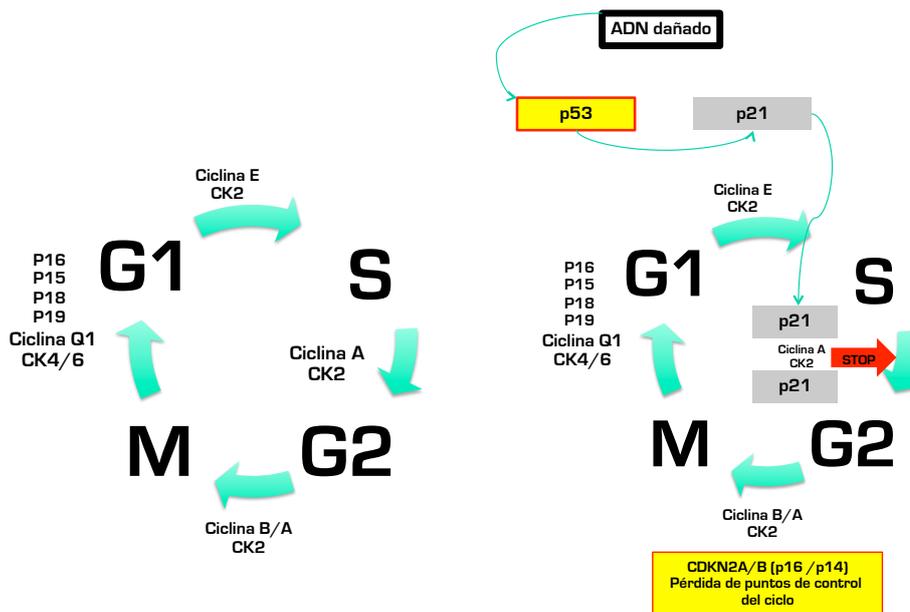


Figura 6.3. Los puntos de control del ciclo celular (p53, las proteínas p16, p14, p15, p18, p19 y las ciclinas y quinasas dependientes de ciclina), son imprescindibles para un control regulado del proceso de síntesis y proliferación celular, así como para la correcta división y diferenciación celular. Los estudios de secuenciación masiva han encontrado alteraciones en estos reguladores.

## ALTERACIÓN DE LA MADURACIÓN B

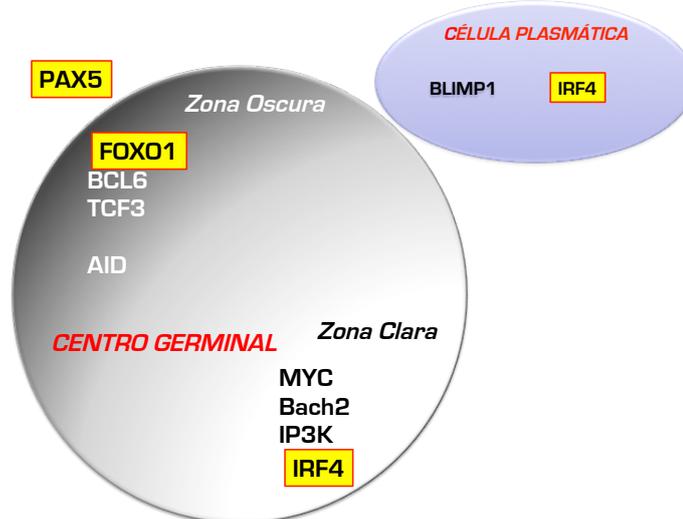


Figura 6.4. Los trabajos llevados a cabo por grupos expertos en el trabajo con centros germinales, ha permitido conocer más en profundidad los mecanismos implicados en la organización estructural de las diferentes subpoblaciones que integran el centro germinal, y cómo se suceden la alternancia de expresión de proteínas fundamentales para llevar a cabo la maduración de la célula B (plasmática o tipo centro germinal). Los genes señalados en amarillo, además de estar siendo muy estudiados en linfomas B agresivos (en general), se han encontrado recurrentemente mutados en los linfomas foliculares con transformación agresiva. La implicación terapéutica de estas dianas y la posible reprogramación de las células B, será fruto de futuros estudios.

## INTRODUCCIÓN

### EVASIÓN INMUNE



Figura 6.4. La mutación de *B2M* parece imposibilitar la expresión de las moléculas HLA-1, lo que imposibilita el reconocimiento de la célula tumoral por el sistema inmune. Las estrategias inmunoterápicas deberán contar con este déficit, y el reconocimiento inmune no deberá basarse en el funcionamiento de péptidos presentados por el CMH tipo 1 en pacientes con afectación de la subunidad B2M.

### ACTIVACIÓN DE LA CÉLULA B

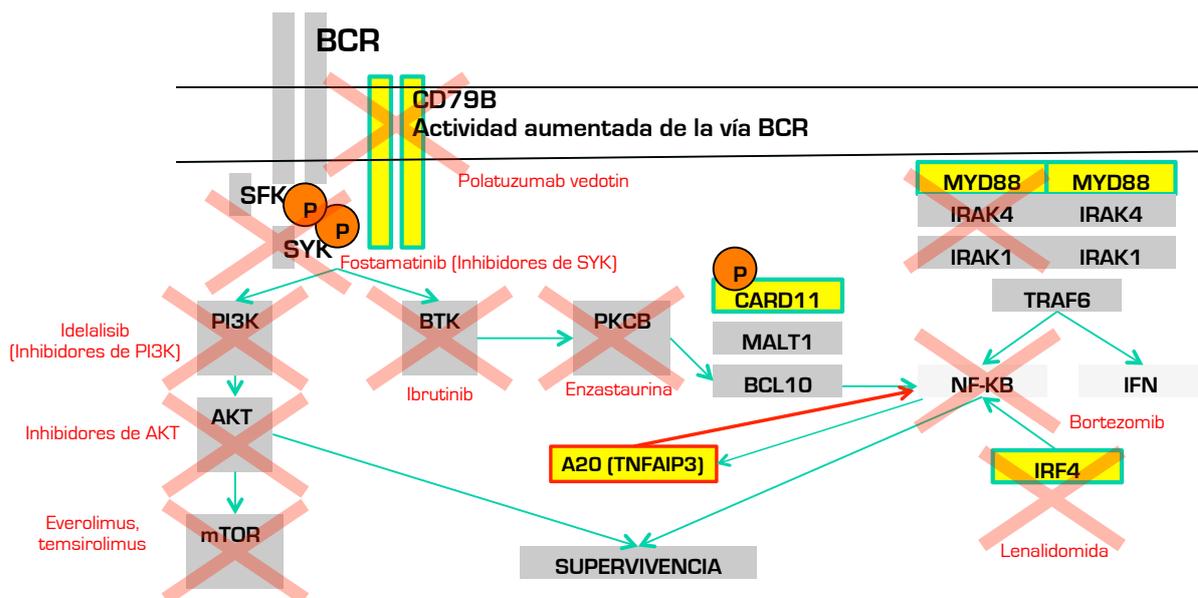


Figura 6.5. Si hay algo que deba tenerse en cuenta a la luz de los resultados de análisis genómico/exómico de los pacientes con LFT, es que a pesar de tener un fenotipo y genotipo semejante al GCB (sobre todo por su origen teórico de un clon folicular previo o al menos relacionado), estos tumores son dependientes de la actividad del receptor de célula B (BCR), y presentan mutaciones activadoras de la vía de BCR (señaladas en amarillo) que hacen que sea una vía potencialmente inhibible farmacológicamente. Este grupo de enfermos, en contraposición con lo que se sugeriría para un paciente con LDCBG tipo GCB, podría beneficiarse de tratamiento con Ibrutinib, lenalidomida, idelalisib, enzastaurina, bortezomib, inhibidores de IRAK4. Sin embargo, deberán realizarse estudios específicos de pacientes con LFT que permitan evaluar la respuesta farmacológica teniendo en cuenta toda la arquitectura clonal, no sólo mutaciones puntuales. La respuesta a estos fármacos, como la lenalidomida en el manto<sup>107</sup>, el idelalisib en LLC<sup>108</sup> y muy particularmente Ibrutinib en enfermedades como el linfoma del manto<sup>109</sup>, la LLC<sup>110</sup>, la MW<sup>111</sup>, son muy prometedoras. Sin embargo, cada enfermedad y más aún cada enfermo posee un perfil de mutaciones cuya suma genera un perfil único que debemos considerar para el diseño de estrategias terapéuticas personalizadas. No se debe de cometer el error de simplificar o generalizar algo que como hemos puesto de manifiesto, es extremadamente rico y heterogéneo.

# HIPÓTESIS DE TRABAJO

---



## HIPÓTESIS DE TRABAJO

El linfoma folicular es el segundo linfoma más frecuente dentro del grupo de los linfomas no Hodgkin. Es una neoplasia de linfocitos clonales de origen B, de evolución lenta, sensible a distintos tratamientos. Sin embargo, a pesar de su curso indolente, en un porcentaje de los pacientes evoluciona hacia un linfoma agresivo.

De los linfomas foliculares y otros linfomas de bajo grado que se transforman a linfomas agresivos, existen varios aspectos que permanecen desconocidos y que motivan la realización de los estudios que componen esta tesis doctoral.

El primero de ellos es el desconocimiento de la frecuencia real con la que ocurre la transformación, debido a la heterogeneidad de los estudios disponibles.

El segundo aspecto se basa en la definición y clasificación de los linfomas transformados. La experiencia clínica nos ha demostrado que la evolución y transformación de los linfomas no sigue un camino único. Existen diferentes patrones y momentos de presentación de la transformación. El grupo de pacientes que se diagnostican de linfoma agresivo, y que en el proceso de estadiaje al diagnóstico presentan afectación en otros órganos por linfomas de bajo grado (característicamente, en la médula ósea -MO-), conocidos como linfomas de afectación "discordante", no se incluyen de forma constante en el grupo de linfomas transformados, probablemente por falta de evidencia científica que permita confirmar la identidad biológica de esta entidad con el modelo clásico de transformación objetivada en el transcurso de un linfoma indolente.

El tercer punto de interés referente a este grupo de linfomas, lo constituye la búsqueda mecanismos subyacentes al proceso de transformación, que sean comunes a diversos linfomas. Si bien se han publicado varios trabajos que estudian el proceso de transformación del linfoma folicular y de la leucemia linfoide crónica, existe muy poca información acerca del motor biológico que es capaz de efectuar la transformación de otros linfomas indolentes.



## OBJETIVOS

---



## OBJETIVOS

- a) **CAPÍTULO 1. ASPECTOS CLÍNICOS DE LA TRANSFORMACIÓN DEL LINFOMA FOLICULAR**
- b) Conocer la incidencia de transformación histológica del linfoma folicular en la era de la inmuno-quimioterapia.
- c) Identificar los factores que influyen en la incidencia de transformación.
- d) Describir las características clínicas de los pacientes que experimentan TH.
- e) Analizar el beneficio de los distintos tratamientos administrados para el linfoma folicular transformado, incluyendo el trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos, en la supervivencia de estos enfermos
- f) Caracterizar clínicamente a los pacientes con linfoma transformado “de novo”.

### **CAPÍTULO 2. ESTUDIO FENOTÍPICO Y GENÉTICO DE LOS PACIENTES CON LINFOMA DIFUSO DE CÉLULAS B GRANDES Y AFECTACIÓN DE LA MÉDULA ÓSEA.**

- g) Conocer el pronóstico clínico asociado a los diferentes tipos de infiltración de la MO.
- h) Realizar la descripción inmunofenotípica de la infiltración discordante de la médula ósea.
- i) Analizar la correlación clonal entre adenopatía y MO en los casos de histologías discordantes. Identificación de casos de transformación.
- j) Analizar la influencia de la célula de origen del LDCBG en la histología del linfoma de la médula ósea.
- k) Frecuencia de aberraciones de los genes *BCL2*, *BCL6*, *CMYC* y *TP53* en el grupo de LDCBG con MO afectada

### **CAPÍTULO 3. ESTUDIO GENÉTICO (EXOMA) DE LOS PACIENTES CON MW QUE EXPERIMENTAN TRANSFORMACIÓN A LINFOMA DE ALTO GRADO**

- l) Conocer las alteraciones moleculares implicadas en el proceso de transformación del grupo de pacientes con linfoma linfoplasmocítico/macroglobulinemia de Waldeström.
- m) Búsqueda de mecanismos moleculares comunes con otros modelos de transformación de linfomas indolentes.







# MATERIALES Y MÉTODOS

---



#### 4.1. Pacientes y muestras

La descripción de los pacientes incluidos se realizará de forma separada para cada uno de los trabajos que integran esta tesis doctoral.

#### CAPÍTULO 1. Aspectos clínicos de la transformación del linfoma folicular

Se reclutaron inicialmente 1874 pacientes diagnosticados de LF en 18 centros diferentes en el grupo español de linfoma y trasplante autólogo de médula ósea (GELTAMO), dentro del proyecto elaborado para la realización de este estudio: GEL-LFT-2014-1.

Los criterios de inclusión para este análisis fueron el diagnóstico inicial de linfoma folicular, grado 1-3a, y la fecha de diagnóstico entre el 1 de enero de 2002 y el 31 de diciembre de 2012.

Los pacientes con una histología “compuesta” o “composite” y/o evidencia de transformación en el momento del diagnóstico (n=68) y , aquellos con grado histológico 3b (n=58), fueron excluidos . Además, 14 pacientes se excluyeron porque no tenían un seguimiento adecuado.

Se incluyeron los 106 pacientes que experimentaron transformación histológica.

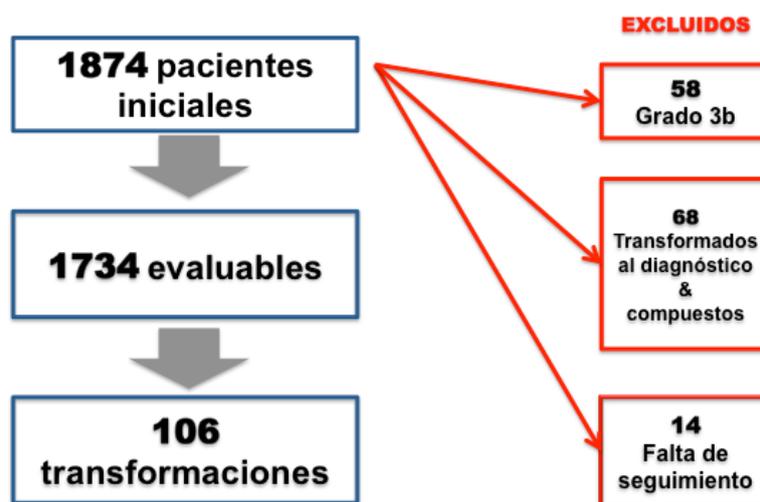


Figura 6. Algoritmo de selección de los pacientes incluidos para el estudio de los aspectos clínicos de la transformación del linfoma folicular: incidencia de transformación del linfoma folicular en la era de la inmunoterapia y análisis del papel del trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos en el tratamiento del linfoma folicular transformado.

## **CAPÍTULO 2. Estudio fenotípico y genético de los pacientes con linfomas con linfoma difuso de células b grandes y afectación de la médula ósea**

### ***Revisión histológica y análisis inmunofenotípico de las muestras de médula ósea infiltradas por linfoma***

Incluimos todos los pacientes diagnosticados y tratados de linfoma difuso de células B grandes en el Hospital Clínico de Salamanca desde el 1 de enero de 1999.

### ***Análisis de correlación clonal entre adenopatía y MO***

Los pacientes en los que el fenotipo y/o la histología de la médula ósea era compatible con linfoma indolente y de los que se disponía de ambas muestras (adenopatía de LDCBG y MO de linfoma indolente) se incluyeron en el estudio de clonalidad.

### ***Estudio clínico retrospectivo***

Para el análisis clínico, se seleccionaron los pacientes diagnosticados de LDCBG (con afectación de médula ósea o sin afectación) tratados en nuestro centro con regímenes curativos basados en rituximab. Se incluyeron en el estudio 170 pacientes.

### ***Análisis genético de los LDCBG con MO afectada. Frecuencia de aberraciones de los genes BCL2, BCL6, CMYC y TP53)***

Para este trabajo se utilizaron células fijadas correspondientes a muestras tumorales de LDCBG con un grado de infiltración superior al 10%.

## **CAPÍTULO 3. ESTUDIO GENÉTICO (EXOMA) DE LOS PACIENTES CON LINFOMA LINFOPLASMOCÍTICO QUE EXPERIMENTAN TRANSFORMACIÓN A LINFOMA DE ALTO GRADO**

Para el análisis genómico de estos 5 pacientes, se recuperaron muestras de ADN de la muestra tumoral en el momento del diagnóstico y en el momento de la transformación hacia linfoma de alto grado. Se realizó la comparación entre ambas secuencias y con respecto a la línea germinal de cada paciente.

### 4.2. Métodos

La descripción de los métodos utilizados para los trabajos desarrollados se expondrá sin separación por capítulos.

#### HISTOLOGIA

##### **Revisión histológica**

La revisión histológica ha sido necesaria para el “Estudio fenotípico y molecular de los pacientes con linfomas con histologías discordantes en adenopatía y médula ósea”. Para la realización de este trabajo, se realizó la revisión de los infiltrados tumorales de médula ósea. Además, se revisaron las adenopatías infiltradas por linfoma difuso de células B grandes para determinar la célula de origen del linfoma agresivo.

##### ***Muestras de médula ósea***

El estudio histológico de médula ósea de los pacientes con linfoma difuso de células B grandes, se habría realizado como parte del estudio de extensión para cada paciente. El estudio anatomopatológico de las muestras de MO habría sido realizado según la técnica habitual, basada en la tinción con Hematoxilina-Eosina, Giemsa, Wilder-reticulina y Masson-colágeno de los cortes de la muestra decalcificada en formol e incluida en parafina.<sup>112</sup> En muchos de los casos en los que fue posible se describió el patrón de infiltración como nodular, intersticial, nódulo-intersticial (mixta) y difusa.<sup>113</sup>

Se definió **histología discordante** como la infiltración por linfocitos de pequeño tamaño, sin atipias citológicas.

Se definió **histología concordante** como la infiltración por células linfoides de tamaño grande, e características citológicas similares a las observada en la adenopatía infiltrada por LDCBG. En algunos casos, se precisó el diagnóstico de LDCBG en MO, y en otros únicamente se definió como linfoma agresivo o de alto grado.

En los casos en los que la histología no era concluyente, habiéndose definido “infiltrado linfoide inespecífico” o similar, o bien no se había detallado el grado histológico de la infiltración, el Servicio de Anatomía Patológica colaboró en la revisión de las muestras, para determinar la infiltración o

## MATERIALES Y MÉTODOS

ausencia de infiltración de las biopsias de médula ósea. Se revisaron un total de 13 casos.

De ellos, 5 no estaban infiltradas, en 4 se trataba de un infiltrado escaso por linfoma de alto grado, y en otros 4, de un infiltrado por linfocitos tumorales de tamaño pequeño y grado histológico bajo.

### *Muestras de adenopatía*

Se utilizó al algoritmo de Hans<sup>114</sup> para determinar, en los casos en los que fue posible, la célula de origen del linfoma agresivo (LDCBG).

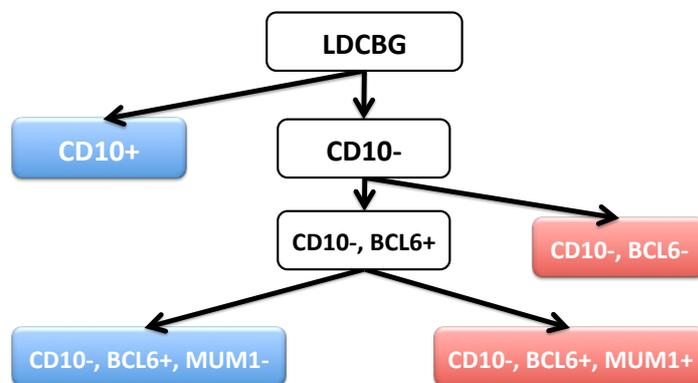


Figura 7. Protocolo de Hans para determinar mediante inmunohistoquímica la célula de origen del LDCBG. En este esquema se representa el algoritmo Hans: en azul, se representan los LDCBG tipo centro germinal y en rojo los LDCBG tipo no-centro germinal.

## INMUNOFENOTIPO

### **Citometría de flujo multiparamétrica**

La citometría de flujo se emplea de forma rutinaria en nuestro centro, en el estudio diagnóstico y de seguimiento de múltiples hemopatías.

La aplicación de esta técnica ha sido necesaria para el capítulo de “Estudio fenotípico y molecular de los pacientes con linfomas con histologías discordantes en adenopatía y médula ósea”. Para la realización de este trabajo, se realizó la revisión del análisis de las suspensiones celulares de las muestras correspondientes a sangre total de aspirado de médula ósea infiltradas por linfoma, en el grupo de pacientes con linfoma difuso de células B grandes.

A continuación, describimos los pasos más importantes que comprenden desde el procedimiento de preparación de las suspensiones celulares e

## MATERIALES Y MÉTODOS

incubación con anticuerpos monoclonales hasta su análisis informático. El análisis inmunofenotípico por CMF se realizó mediante marcaje inmunofluorescente directo y posterior lisis eritrocitaria de acuerdo con métodos previamente descritos.<sup>115,116</sup> Para el estudio de linfocitos B, en los estudios de 4 colores, se utilizaron anticuerpos monoclonales conjugados con uno de los siguientes fluorocromos: isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE), tandem PE/cianina 5 (PE/Ci5), pteridil-clorofil-proteína (PerCP) y alofocianina (APC). En los estudios de 8 colores, los fluorocromos empleados fueron: Pacific Blue, Pacific Orange, isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE), pteridil-clorofil-proteína (PerCP), tandem PE/cianina 5 (PE/Cy5.5), tandem PE/cianina 7 (PE/Cy7), alofocianina (APC), alofocianina H7 (APC H7).

En los casos de estudios con 4 colores, en un primer paso, se emplearon las siguientes combinaciones de anticuerpos monoclonales (AcMo): FMC7/CD5/CD19/CD45, sK/sL/CD19/CD20, ampliándose el estudio si así lo indicaban los criterios clínicos del paciente y los resultados obtenidos en el primer paso. Dado que en muchos pacientes el diagnóstico ya había sido confirmado en la adenopatía, no se profundizó siempre en el estudio antigénico, determinando en muchas ocasiones únicamente clonalidad (kappa/lambda) cuando ésta era posible. En estos casos, la adquisición se realizó en un citómetro FACSCalibur™ (BD Biosciences (BDB), San José, CA) con un procedimiento de doble paso, empleando el software CellQUEST (BDB). En los casos en los que se realizaba una segunda adquisición, ésta se realizaba guiada mediante una ventana electrónica definida por SSC y CD19+, en la que se adquirirían un número de células clonales suficiente para identificar y caracterizar la población patológica. El análisis de los datos se realizó mediante el programa informático Paint-a-Gate PRO (BDB) o más recientemente, con el software Infinicyt (Cytognos), y en la revisión de estos estudios para el trabajo actual, utilizamos el software Infinicyt.

En los estudios de 8 colores, para el estudio de extensión en MO, se utilizó la combinación de anticuerpos monoclonales CD20 CD4 CD45 Smlg Smlgk CD5 CD19 SmCD3 CD38, según las recomendaciones del grupo Euroflow<sup>117</sup> con el fin de detectar población B clonal. Y solamente en casos excepcionales, donde el estudio diagnóstico se hizo en MO por falta de acceso

## MATERIALES Y MÉTODOS

a muestra de adenopatía u otras razones concretas, se realizó el estudio completo de síndrome linfoproliferativo crónico B.

Para evaluar el perfil antigénico de las células B, y seleccionar la población tumoral, se definió: la expresión de antígenos, el patrón de expresión y porcentaje de linfocitos B con expresión positiva para cada antígeno

Con los datos disponibles en la revisión, se reclasificaron algunos de los fenotipos tumorales acorde a los fenotipos más frecuentes para muchos de estos síndromes linfoproliferativos, atendiendo al tamaño celular y la expresión antigénica.

En el caso de aquellos en los que únicamente se había realizado el tubo de clonalidad B, o bien el fenotipo no era específico de ninguna entidad concreta, se clasificaron como “inespecíficos”.

	slg	CD5	CD10	CD20	CD11c	CD23	CD25	CD38	CD79b	FMC7
<b>LLC-B</b>	d	+	-	d	-/+	++	+	-/+	d	-
<b>LLP</b>	+	-	-	+	-	-	+	-/+	-	-/+
<b>LEZM</b>	+	-/+	-	+	+	-	-/+	-	+	+
<b>LF</b>	+	-	+	+	-/+	-/d	-/+	+	+	+
<b>LCM</b>	+	+	-	+	-/+	-	-/+	-	+	-/+
<b>LDCBL</b>	+	-	-	+	-/+	-	-	+	+	+
<b>LB</b>	-/+	-	+	+	-	-	-	++	-/+	+

Tabla 1. Adaptado de Orfao et al. “B-CLL”.Humana Press, 2004

### TECNICAS GENETICAS Y MOLECULARES

#### **Extracción de ácidos nucleicos**

El estudio molecular fue fundamental para los capítulos segundo y tercero de este trabajo de tesis doctoral. Se utilizaron muestras de ADN correspondientes al momento del diagnóstico procedentes de los tejidos en estudio, que habían sido preservadas en el Hospital Clínico Universitario de Salamanca, tras el consentimiento informado de los pacientes, que habían aprobado su utilización con fines clínicos y científicos. La obtención de ADN se llevó a cabo a partir de las muestras de sangre medular, y de tejido tumoral (adenopatía o masa tumoral). Para extraer el ADN se utilizó DNAzol® (Molecular Research Center, Cincinnati, OH, USA) de acuerdo con las indicaciones del fabricante. En algunos casos en los que no se disponía de

## MATERIALES Y MÉTODOS

ADN congelado del momento del diagnóstico se extrajo ADN a partir de las biopsias parafinadas o de células fijadas y conservadas en los laboratorios de Anatomía Patológica y Citogenética respectivamente.

### **Amplificación de genes IGHV**

Para la amplificación de la secuencia VDJH completa, correspondiente al gen de la cadena pesada de las inmunoglobulinas, se siguió el protocolo BIOMED-2.<sup>118</sup>

En este protocolo, se utilizan tres conjuntos diferentes de cebadores específicos de las diferentes familias de segmentos VH y un cebador consenso para la región JH. La amplificación se realiza por tanto en tres diferentes reacciones de PCR multiplex que cubren las tres regiones marco (FR1, FR2 y FR3).

Todas las reacciones se llevaron a cabo en 50 µl de volumen total que contendrían 0,1 mg de muestra de ADN “problema”, y 10 pmol de cada cebador.

### **Análisis de clonalidad. Gene Scan**

Llamado también análisis de “fragmentos fluorescentes”. El análisis de los fragmentos clonales con este sistema, se basa en el marcaje con fluorocromos de uno de los cebadores con los que se realiza la PCR. Después de la amplificación, los productos amplificados se separan en un sistema de electroforesis en capilares de polímeros.

El procedimiento consiste en la adición de 1 microlitro del producto de PCR problema a 0.5 microlitros de un producto que tiene un peso molecular constante, (GeneScan 400-ROX, Applied Biosystems, Foster City, CA) y 9 microlitros de formamida desionizada, que permiten la separación por desnaturalización del ADN en cadenas simples.

Los productos se detectan automáticamente por su fluorescencia, gracias a un sistema láser integrado en un secuenciador automático de ADN (ABIPrism 3100, Applied Biosystems).

Para la interpretación de los resultados, se consideran fragmentos monoclonales si se obtienen uno o 2 picos de producto amplificado siempre y cuando la longitud del fragmento estimada (en pares de bases) esté en

## MATERIALES Y MÉTODOS

consonancia con el producto amplificable en la técnica. Si se detectan de 3 a 5 picos puede considerarse como un resultado oligoclonal y más de 5 picos de longitudes diferentes como un resultado policlonal. Para considerar un resultado como un patrón monoclonal verdadero, la altura de un pico debe ser de al menos el doble de la distribución normal de los picos policlonales, correspondientes a las células reactivas acompañantes del infiltrado.

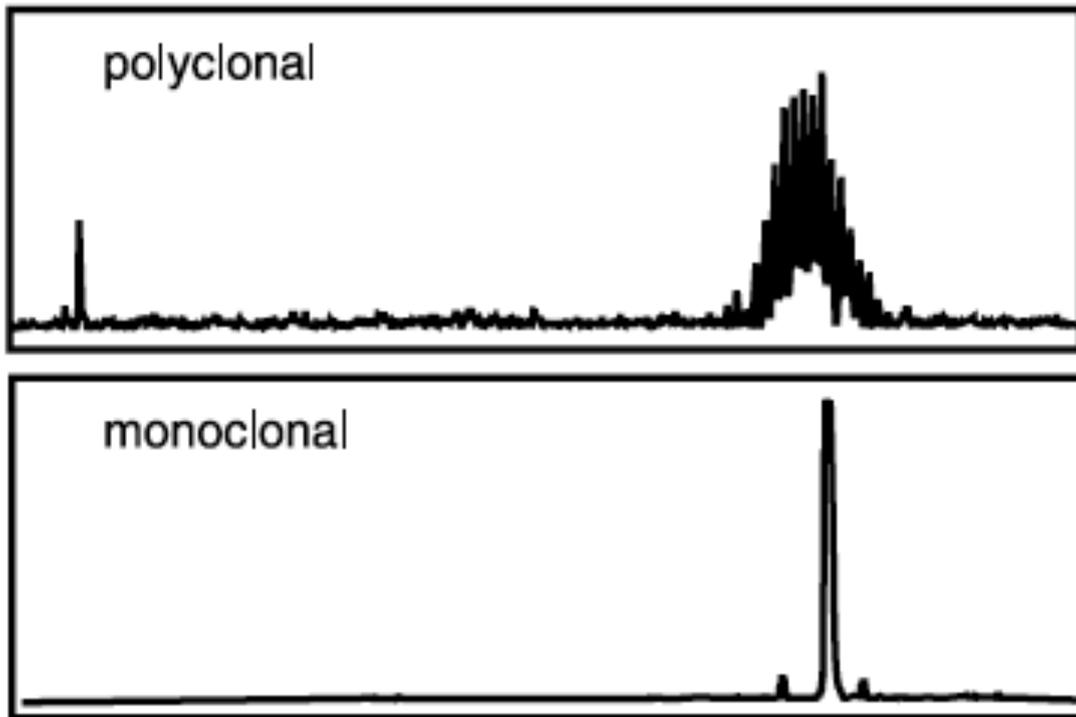
### ***Amplificación de fragmentos marcados mediante GeneScan***

- ✓ Muestra: 1 mcrl de producto de PCR en cada pocillo de la placa de GeneScan.
- ✓ Master mix: Se elabora con 10 mcrl por muestra de formamida desionizada (Hi-Di)+ 0.3 mcrl por muestra del marcador de peso molecular. Se utilizarán 10 mcrl de la mezcla a cada pocillo.
- ✓ Desnaturalización del producto de PCR: 2 min a >95°C .
- ✓ Enfriar a 41°C durante una hora.

### ***Condiciones de la electroforesis capilar***

- ✓ Polímero: como por ejemplo, el polímero 3100 POP4.
- ✓ Buffer: como ejemplo, el 1\_3100, con EDTA.
- ✓ Electroforesis: 45 minutos (en función del tamaño de los fragmentos).
- ✓ Intensidad óptima de señal fluorescente: Hasta 10.000 unidades de fluorescencia.

Figura 8. Imagen generada por electroforesis capilar donde se representa un patrón policlonal



(imagen superior) y monoclonal (inferior). Adaptado de JJM van Dongen et al. PCR-based clonality studies in lymphoproliferation. *Leukemia* 2003 (17), 2257-2317

### **Secuenciación convencional (Sanger) de los fragmentos clonales VDJH**

Una vez confirmada la clonalidad de los productos de PCR, éstos se secuenciaron en el secuenciador automatizado de ADN ABI 377 utilizando terminadores Big-Dye (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Una vez obtenidos los productos de PCR de la reacción de amplificación, se procederá a purificar el producto de PCR, iniciar la reacción de secuenciación y su amplificación para la secuenciación y finalmente se procederá a la secuenciación.

#### ***Purificación de productos de PCR***

- ✓ 10 microlitros de producto de PCR
- ✓ 1.5 microlitros de reactivo EXO-SAP
- ✓ Se corre el programa *EXOSAP* en el termociclador

#### ***Reacción de secuenciación***

- ✓ Agua. 2,5 microlitros
- ✓ Buffer 1,25 microlitros

## MATERIALES Y MÉTODOS

- ✓ BigDye 0,75 microlitros
- ✓ Primer 1 microlitro.

Se seleccionará el sentido de la secuenciación. Inicialmente secuenciaremos el fragmento desde JH hasta VH.

Para ello, utilizaremos primers consenso (JH-NO FAM) que permitirán conocer el segmento VH concreto del reordenamiento. Si queremos realizar la secuenciación desde el segmento VH hasta JH, utilizaremos el primer concreto de la VH que hayamos obtenido en la secuenciación desde el segmento JH.

La combinación de ambas secuencias nos permitirá conocer la región hipervariable CDR3.

- ✓ Añadiremos 2 microlitros del producto de PCR purificado obtenido en el paso anterior.
- ✓ Correremos el programa BigDye\_kit fast en el termociclador

### ***Secuenciación en placa***

#### *Purificación con acetato/etanol*

- ✓ 1 microlitro de buffer con acetato de sodio + 1 microlitro de EDTA (125) en cada pocillo
- ✓ Se lleva la placa a la centrifuga y se activa el programa 3 de 1000 rpm.
- ✓ Añadimos en cada pocillo 25 microlitros de etanol al 100%.
- ✓ Se coloca tapa de goma y se da un vórtex.
- ✓ Centrifugamos en el programa 2 durante 30 minutos.
- ✓ Sobre un papel, se vuelca la placa, y se le da un spin boca abajo en la centrifuga a 1000 rpm.
- ✓ Se saca la placa y echamos en cada pocillo 40 microlitros de etanol al 80% y se centrifuga nuevamente en el programa 1 (5 minutos).
- ✓ Sobre un papel, se vuelca la placa, y se le da un spin boca abajo en la centrifuga a 1000 rpm.
- ✓ Sacamos y añadimos en cada pocillo 15-20 microlitros de formamida y damos un spin boca arriba y sin tapar.

- ✓ Se mete en el secuenciador y se inicia el programa de secuenciación

### **Secuenciación de exoma completo**

Se seleccionaron 5 pacientes diagnosticados de Macroglobulinemia de Waldenström (MW), de los cuáles se disponía de ADN de muestras tumorales seleccionadas a lo largo de la historia de la enfermedad (incluyendo el momento del diagnóstico y transformación a LDCBG y ADN genómico para realizar los estudios comparativos). (Ver tabla 2). Se añadió una muestra de una recaída agresiva de un paciente. Para poder realizar este trabajo se contactó con la empresa de secuenciación DreamGenics, Oviedo.

### ***Cuantificación y controles de calidad de ADN***

Una vez extraído el ADN, se realizaron los controles de calidad de ADN, previo al enriquecimiento y generación de librerías. Se realizaron controles de calidad cualitativos y cuantitativos. Ambos fueron realizados en la empresa MacroGen que llevó a cabo el procedimiento de enriquecimiento y secuenciación:

- Medición de la cantidad de ADN mediante fluorimetría que cuantifica ADN de doble cadena, y evita sobreestimar la cantidad real.
- Evaluación de la calidad de ADN mediante electroforesis en gel. Los “smears” del ADN se interpretan como presencia de impurezas o contaminantes; la presencia de un patrón “en escalera” debajo de la banda de interés, sugeriría la presencia de ADN de pequeño tamaño, o fragmentado. (Figura 9).

### ***Enriquecimiento y generación de librerías***

Se realizó utilizando el kit Agilent SureSelect XT2 V5. Para una correcta ligación de las sondas (que en este kit son de ARNc, y de unos 120 nucleótidos o 120-mer) y cobertura de 51 Mb, se necesita 1 microgramo de ADN que cumpla las características previamente descritas. Por este motivo, 3 de las muestras seleccionadas inicialmente, fueron desechadas por no cumplir estos estándares (Ver tabla 2 y figura 9).

## MATERIALES Y MÉTODOS

MUESTRA ID	PACIENTE	MOMENTO EVOLUTIVO	PORCENTAJE INFILTRACIÓN (CMF)	CALIDAD DE ADN	PROFUNDIDAD DE LECTURA
1-1	P1	Diagnóstico	12	OK	200x
1-2	-	Transformación	40	OK	150x
1-3	-	No tumoral (Germinal)	0	OK	100x
2-1	P2	Diagnóstico	22,4	OK	200x
2-2	-	Transformación	51,3	OK	150x
2-3	-	No tumoral (Germinal)	0	OK	100x
2-4	-	Recaída	70	OK	150x
3-1 (7)	P3	Diagnóstico	16	NO BANDA	
3-2	-	Transformación	16 (8 + 8)	OK	200x
3-3 (9)	-	No tumoral (Germinal)	0	NO CALIDAD	
4-1	P4	Diagnóstico	7,6	OK	200x
4-2 (11)	-	Transformación	9,4 (5,2 + 4,2)	NO BANDA	
4-3	-	No tumoral (Germinal)	0	OK	
5-1	P5	Diagnóstico	11	OK	200x
5-2	-	Transformación	54,6 (43,6+11)	OK	150x
5-3	-	No tumoral (Germinal)	0	OK	100x

Tabla 2. Se muestran en gris las muestras excluidas del análisis por no cumplir los criterios de calidad requeridos. P= Paciente. CMF= Citometría de flujo.

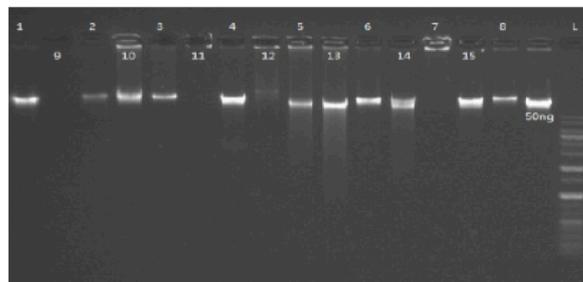


Figura 9. Se muestran la ausencia de banda de ADN en las muestras 7, 9 y 11, que sí se habían detectado mediante otros métodos de cuantificación de ADN y que tras este análisis de calidad fueron excluidos del análisis.

El protocolo de generación de librerías consiste en varios pasos:

- ✓ Fragmentación del ADN, que en este caso se realizó mediante sonicación.
- ✓ Enriquecimiento:
  - Reparación de extremos de los fragmentos
  - Poliadenilación de los extremos 3' de los fragmentos obtenidos
  - Ligación de adaptadores ("paired ends")<sup>119</sup> utilizando SureSelect Ligation Master Mix (ver figura 10).
  - Amplificación de los fragmentos reparados, y tras la adición de los adaptadores, mediante PCR con un número de ciclos que permita aumentar la muestra sin introducir errores.

## MATERIALES Y MÉTODOS

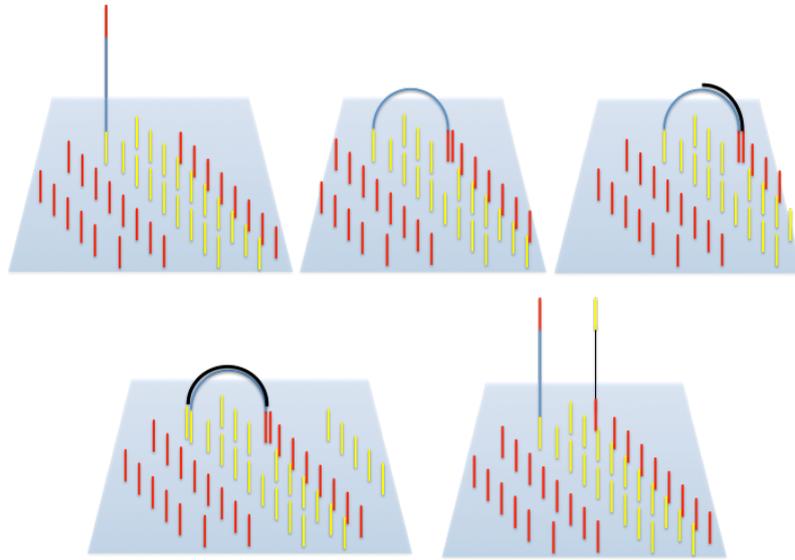


Figura 10. Imagen adaptada a partir de las ilustraciones de [www.illumina.com](http://www.illumina.com). Se representan los adaptadores (en rojo y amarillo). En la primera figura, se muestra la ligación de un fragmento de ADN a dos adaptadores diferentes y no complementarios en cada extremo. El adaptador rojo se liga con su homólogo (rojo también) en la segunda figura. Se inicia la síntesis a partir de este adaptador hasta finalizar en el adaptador amarillo. Posteriormente, recuperan su posición inicial (representada en vertical) y vuelve a comenzar el ciclo. Esto sucede a la vez para miles de fragmentos de ADN, con lo que se consigue una gran amplificación.

- ✓ Hibridación de sondas biotiniladas de ARNc con la librería de ADN generado.
- ✓ Selección de las regiones hibridadas utilizando bolas de estreptavidina.
- ✓ Amplificación de las regiones capturadas mediante PCR. Utilizaremos el menor número de ciclos posible/necesario para evitar introducir errores. Finalmente, se preparará la muestra antes de iniciar la la secuenciación.

### ***Secuenciación***

Se realizó la secuenciación (“paired-end”) de los fragmentos generados utilizando la plataforma HiSeq 2000 de Illumina (secuenciación mediante síntesis). Se seleccionó una profundidad de lecturas (número de lecturas para cada base) en función de la infiltración de la muestra. Las muestras de ADN germinal se consiguieron secuenciar con una profundidad media de 100x, las de ADN tumoral con una profundidad de 150x o 200x según la infiltración tumoral fuera superior al 40% o inferior.

### ***Análisis bioinformático***

Para el análisis bioinformático (DreamGenics, Oviedo) se utilizaron algoritmos y pipelines no comerciales para llamar a las variantes, analizarlas y compararlas. De forma general, los datos generados por el secuenciador,

fueron convertidos a un archivo FastQ, a través del software “Illumina Consensus Assessment of Sequence and Variation, versión 1.8”. Fueron pareados y comparados con la secuencia del genoma humano de referencia (Genome Reference Consortium human build 37, human genome 19) con el programa BWA.<sup>120</sup> Las variantes (detectadas al comparar cada lectura con la secuencia de referencia) se nombraron utilizando el Atlas-SNP y el Atlas-indel.<sup>121</sup> Aquellas con índices de calidad subóptimos según los criterios incorporados en la pipeline se desecharon.

Se admitieron aquellas variantes no presentes en la muestra germinal (somáticas) o con una frecuencia inferior al 0.5% en la muestra germinal, con una frecuencia alélica poblacional inferior al 5% en comparación a lo registrado en la base Human Gene Mutation Database<sup>122</sup>, con más de 3 lecturas, presentes en la base de variantes tumorales COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer)<sup>123</sup> o bien no presentes en COSMIC pero cuya traducción generaría alteraciones en la secuencia proteica: cambios de aminoácidos (no sinónimas), generación o pérdida de un codon STOP, alteración del splicing, cambio en la pauta de lectura, o afectación de la primera metionina iniciadora de la secuencia. Además, se excluyeron algunas mutaciones, según su distancia respecto a las sondas de Agilent V5.

Dado que disponíamos de al menos dos muestras en 3 de los pacientes, el análisis bioinformático se realizó comparándolas por parejas (dos a dos): ADN germinal (tomado como referencia) frente a la muestra al diagnóstico, y la misma comparación tomando como referencia la muestra al diagnóstico; muestra al diagnóstico frente a la transformación tomando una y otra como referencia y lo mismo para la muestra a la transformación y la muestra de ADN germinal.

### ***Interpretación de las variantes***

Dado que conocíamos la infiltración de la muestra tumoral en todos los momentos evolutivos, estimamos el porcentaje de células correspondientes al clon tumoral. Utilizamos genes conocidos presentes en la enfermedad desde su diagnóstico como controles internos para normalizar la frecuencia de las variantes. Para responder a la hipótesis planteadas nos centramos en las mutaciones clonales principales en el momento de la transformación que ya

estaban presentes al diagnóstico, así como a las propias de la transformación. Se estudió cada paciente por separado, y posteriormente se describieron las mutaciones comunes más frecuentes para cada momento evolutivo.

### **Hibridación in situ fluorescente (HISF ó FISH)**

El estudio de hibridación in situ fluorescente para detectar los reordenamientos de los genes *IGH*, *MYC*, *BCL2* y *BCL6*, fue fundamental para el capítulo tercero de este trabajo de tesis doctoral decidimos analizar la frecuencia de estos eventos genéticos en el grupo de pacientes con LDCBG y afectación de médula ósea de cualquier histología.

Los estudios de FISH se llevaron a cabo en el grupo de pacientes con LDCBG y con médula ósea infiltrada. Se utilizaron células fijadas Carnoy conservadas en el diagnóstico. Las muestras correspondían a ganglios linfáticos en la mayoría de los pacientes, aunque en los casos concordantes sin muestra ganglionar disponible en los que la MO estaba infiltrada por LDCBG, se usaron muestras de MO. Se estudiaron las traslocaciones de *MYC* y *BCL6*, la traslocación (14;18)(q21;q32) y la región 17p13.1 mediante el uso de las sondas break apart "LSI MYC" y "LSI BCL6", la sonda de fusión "LSI IGH/BCL2" y la sonda "LSI TP53" de Abbott Molecular (Des Plaines, IL) siguiendo las recomendaciones del fabricante

### ***Materiales***

- ✓ Fijador Carnoy: para fijar las células.
- ✓ Pepsina, soluciones alcohólicas y detergentes: para realizar el proceso de permeabilización de la membrana celular y nuclear, para lograr el paso de las sondas marcadas al núcleo celular.
- ✓ Sondas comerciales para cada región estudiada:
  - LSI *MYC* Dual Color Break Apart Rearrangement (8q24)
  - LSI *BCL6* Dual Color Break Apart Rearrangement (3q27)
  - Vysis *IGH/BCL2* Dual Color Dual Fusion Translocation Probe t(14;18)(q32;q21)
  - LSI *TP53* Probe → 17p13.1 (TP53 gene)
- ✓ Solución de contratinción: 70 µl de DAPI (4,6diamidino-2 phenylindole) en 70 mL de 2X SSC.

## MATERIALES Y MÉTODOS

- ✓ Vectashield® (Vector).
- ✓ Buffer de hibridación (Abbot Molecular/Vysis).

### ***Procedimiento***

#### Permeabilización

1. Se extiende una gota de células fijadas en un porta. Se deja secar.
2. Se inicia el proceso de digestión/ permeabilización de la membrana celular y nuclear utilizando HCl y pepsina.
3. Se lava y permeabiliza la muestra utilizando una solución de paraformaldehído 2% en 1X PBS

#### Montaje de las sondas

1. Añadir 7 µL de buffer de hibridación; 2 µL de agua destilada; 1 µL de la sonda que se va a utilizar.
2. Añadir 2 µL de la mezcla de cada sonda a cada portaobjetos, cubrir con un cubreobjetos redondo de 10 mm de diámetro y sellar con pegamento.
3. Colocar los portaobjetos ya sellados y secos, con el cubreobjetos hacia arriba, en el termociclador Hybrite con agua destilada. Activar el programa 1 (6 min a 75 °C y 20 h a 37 °C).

#### Lavados post-hibridación

1. Eliminar el pegamento de sellado y, si es posible, el cubreobjetos sin forzar las células.
2. Realizar un lavado con 0,4X SSC (100 mL + 300 µL de Tween 20) 2 min.
3. Contratinción: introducir los portaobjetos en un recipiente con la solución de contratinción durante 2 min.
4. Añadir a cada portaobjetos una gota de Vectashield® y colocar un cubreobjetos (habitualmente de 24 x 50 mm). Se sellan los laterales con esmalte para evitar que se introduzca el aceite de inmersión al analizar los portaobjetos.

#### Análisis

Para analizar la HISF se utilizó un microscopio epifluorescente con rueda de filtros (DAPI, FITC, TRITC). Se contaron un total de 200 núcleos. El nivel de corte para la identificación de traslocaciones de *IGH* (sondas de “fusión / break-apart”) fue el 10%

### MÉTODOS ESTADÍSTICOS

#### **Análisis estadístico**

Los análisis estadísticos se realizaron con los programas estadísticos SPSS v20.0 (IBM Corp., Armonk, NY) y el software R, disponible online.

Para evaluar las asociaciones estadísticas entre las variables categóricas se utilizó el test Chi-cuadrado con la corrección de Yates y la prueba exacta de Fisher cuando estaban indicadas.

La comparación de medias entre dos grupos, independientes en los trabajos presentados en esta tesis doctoral, se efectuó con la prueba de la t de Student para datos independientes y el test no paramétrico de la U de Mann-Whitney en el caso de no cumplirse las condiciones de normalidad.

Los estudios de supervivencia global se efectuaron utilizando las curvas de Kaplan-Maier. La comparación entre la supervivencia de grupos independientes se realizó mediante el test de Log-Rank o de Breslow cuando fue oportuno. Los estudios de incidencia acumulada se realizaron considerando riesgos competitivos, y la comparación de incidencia entre grupos independientes se realizó mediante el test de Gray, indicado para estudios de incidencia acumulada.<sup>124</sup>





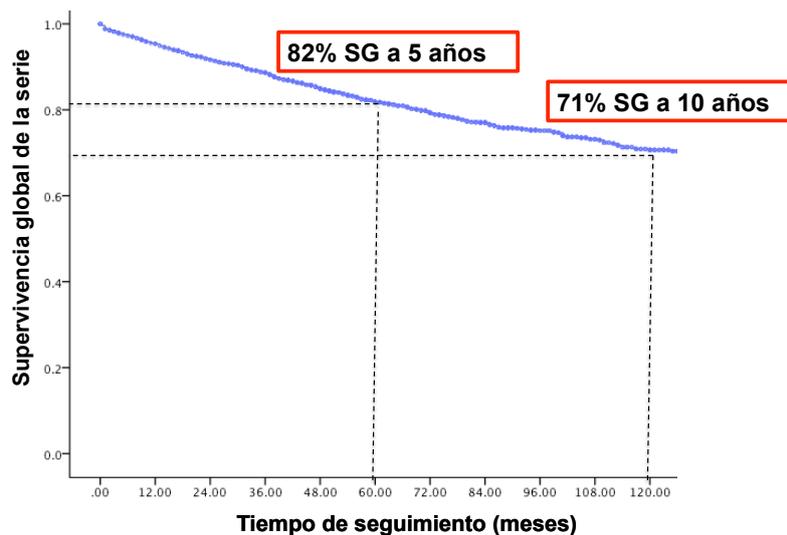


## RESULTADOS

---

**ASPECTOS CLÍNICOS DE LA TRANSFORMACIÓN DEL LINFOMA FOLICULAR.****RESULTADOS****CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES Y TRATAMIENTO**

De los 1734 pacientes evaluables, 800 (46%) eran hombres y 934 (54%) mujeres, con una edad media al diagnóstico de 59 años (rango de 14 a 100). La distribución histológica era la siguiente: FL grado 1, 634 casos (37%); grado 2, 609 (35%); grado 3a, 270 (15%), grado 1-2, 221 (13%). Las características principales iniciales de los pacientes se muestran en la tabla 2. Con una mediana de seguimiento de 6,6 años, 368 pacientes murieron, con una supervivencia global (SG) a los 10 años del 72% (IC del 95%: 69-75), como se muestra en esta curva de supervivencia:



Las estrategias terapéuticas y tratamientos (combinaciones detalladas) administrados figuran en la tabla 3. En 139 pacientes (8%) se estableció estrategia de observación, mientras que 1.595 recibieron algún tratamiento al diagnóstico. En resumen, 1238 pacientes (71%) fueron tratados con rituximab, solo ( $n = 84$ , 5%) o en combinación ( $n = 931$ , 54%); se emplearon regímenes basados en antraciclinas en 270 (16%) de los pacientes y análogos de la purina en 270 (15%).

La respuesta fue evaluable en 1571 pacientes (98.5%) de los casos tratados. Alcanzaron respuesta completa (RC) o incierta (RCi) 1192 (76%)

RESULTADOS. CAPÍTULO 1

pacientes, mientras que 281 (19%) tuvieron respuesta parcial (RP), y 98 (5%) no mostraron respuesta, progresaron o experimentaron muerte temprana.

Variable	n (%)
<b>Edad, años [mediana]</b>	59 [14-100]
<b>Sexo femenino</b>	934 [54%]
<b>Grado histológico</b>	
1	634 [36.6%]
2	609 [35.1%]
3a	270 [15.6%]
ND	221 [12.7%]
<b>FLIPI</b>	
0-1 (Riesgo bajo)	546 [31.5%]
2 (Riesgo intermedio)	504 [29.1%]
3-5 (Riesgo alto)	482 [27.8%]
ND	202 [11.6%]
<b>Ann Arbor</b>	
I	211 [12.2%]
II	201 [11.6%]
III	313 [18.0%]
IV	980 [56.5%]
ND	29 [1.7%]
<b>Primera línea de tratamiento</b>	
Observación	139 [8.0%]
Rituximab	1238 [71.4%]
Antraciclinas	931 [53.7%]
Fludarabina	270 [15.6%]
<b>Respuesta (n= 1595 tratados)</b>	
RC / RCi	1192 [74.7%]
RP	281 [17.6%]
NR, Exitus	98 [6.1%]
NE	24 [1.5%]

Tabla 3. Características basales de los pacientes incluidos en el estudio de incidencia. ND: No disponible, RC: Respuesta completa, RCi: Respuesta completa incierta, RP: Respuesta parcial, NR: No respuesta, NE: No evaluable

Variable	N= 1734 n (%)
<b>Combinaciones en primera línea (LF)</b>	
RCHOP	742 [42.8%]
RCVP/RCOP	172 [9.9%]
CHOP	88 [5.1%]
CVP/COP	38 [2.2%]
Bendamustina	24 [1.4%]
Basados en fludarabina	270 [15.5%]
Radioterapia en monoterapia	78 [4.5%]
Rituximab en monoterapia +/- RT	85 [5.4%]
Ciclofosfamida + Prednisona	47 [2.7%]
Otros/ND	51 [2.9%]

Tabla 4. Regímenes de tratamiento empleados en primera línea; R: Rituximab, C: Ciclofosfamida, H: Adriamicina, O: Vincristina, P: Prednisona, V: VP16 (etopósido), RT: Radioterapia, ND: No disponible

### INCIDENCIA ACUMULADA DE TRANSFORMACIÓN HISTOLÓGICA (IATH)

106 pacientes finalmente desarrollaron TH demostrada por biopsia. 7 pacientes adicionales con sospecha de transformación se excluyeron del análisis debido a la falta de documentación histológica. La gran mayoría de los casos (n = 102) correspondió a LDCBG, tres de ellos tenían histología de linfoma inclasificable con características intermedias entre linfoma de Burkitt y LDCBG, BCLU, y uno tenía un linfoma de histología compuesta.

El tiempo desde el diagnóstico hasta la TH fue de 2,5 años (rango, 0,3-12,5). La IATH a los 5, 10 y 15 años fue del 5%, 8% y 12%, respectivamente (figura 9).

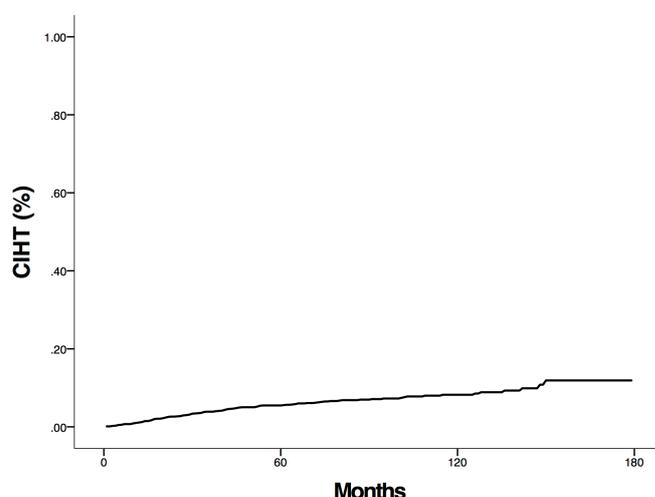


Figura 11. Incidencia acumulada de transformación de la serie de pacientes (n=1734). CIHT (IATH) Cumulative incidence of histologic transformation (Incidencia acumulada de transformación histológica)

La única de las variables clínicas al diagnóstico asociada con la incidencia de transformación fue el FLIPI (IATH a los 10 años del 7%, 9% y 14% para FLIPI de alto riesgo bajo, intermedio y, respectivamente;  $p < 0,001$ ) (tabla 4, figura 10).

Variable	Nivel de significación (p)
<b>FLIPI alto riesgo</b>	<b>&lt;0.001</b>
<b>Respuesta al tratamiento de 1ª línea</b> <i>No respuesta &gt; RP &gt; RC</i>	<b>&lt;0.001</b>
Tratamiento vs WWW	0.1
Grado histológico	0.5
B2 microglobulina	0.1
Sexo (V)	0.8

Tabla 5. Análisis univariante de las variables que influyen en la incidencia acumulada de transformación histológica.

## RESULTADOS. CAPÍTULO 1

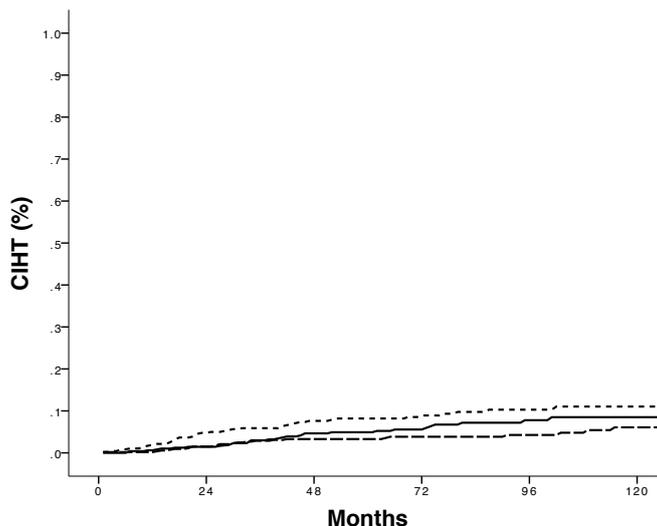


Figura 12. Los pacientes con FLIPI de riesgo elevado (línea punteada) tuvieron mayor IATH que los de riesgo intermedio (línea continua) y que los de riesgo bajo (línea discontinua); CIHT (IATH) Cumulative incidence of histologic transformation (Incidencia acumulada de transformación histológica)

La estrategia inicial (tratamiento vs observación) no se relacionó con una mayor IATH a los 10 años (15% en observados frente a 9% para los pacientes tratados,  $p = ns$ , figura 11).

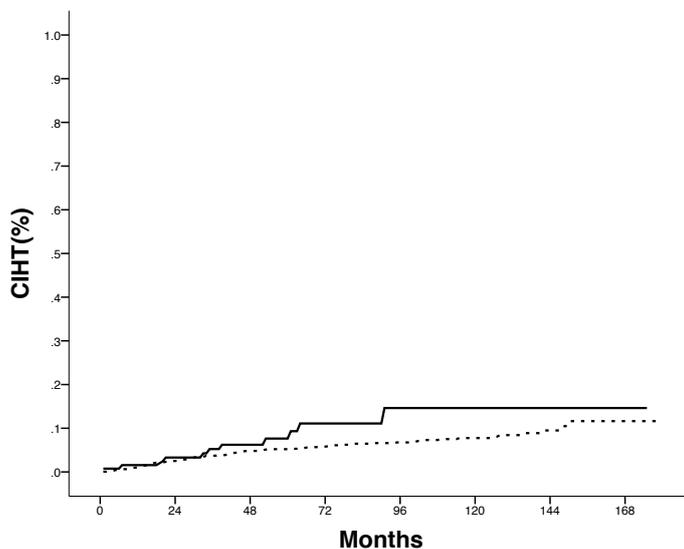


Figura 13. La estrategia inicial de tratar (línea punteada) vs abstención (línea continua) no se asoció a un incremento significativo del riesgo de transformación; CIHT (IATH) Cumulative incidence of histologic transformation (Incidencia acumulada de transformación histológica)

No destacó ninguna modalidad específica de tratamiento, incluyendo el uso de rituximab (7,2% vs. 9,2%,  $p = 0,2$ ) con una IATH significativamente superior. Los pacientes que alcanzaron la remisión completa después del

tratamiento de inducción sí mostraron una menor IATH a los 10 años frente a los que alcanzaban respuesta parcial o aquellos refractarios (6%, 11% y 30%, respectivamente;  $p < 0,001$ ) (tabla 4, figura 12).

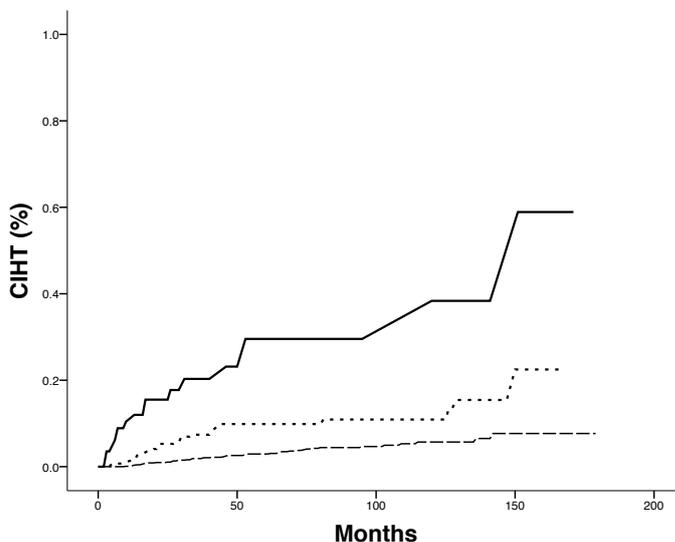


Figura 14. Los pacientes refractarios tuvieron una incidencia de transformación claramente superior a aquellos que respondieron parcial o completamente (incluyendo RCi) a la primera línea de tratamiento del LF. CIHT (IATH) Cumulative incidence of histologic transformation (Incidencia acumulada de transformación histológica)

Se realizó un análisis multivariado para evaluar las variables más importantes de asociación independiente con el riesgo de transformación, incluyendo el FLIPI, y la respuesta al tratamiento como variable dependiente del tiempo, excluyendo las no significativas en el análisis univariado. En el modelo final con 1483 casos, tanto FLIPI de alto riesgo (HR 2.6; IC 95%: 1,5-4,5) como la refractariedad a la primera línea de tratamiento (HR 2,9% IC 95%: 1.3-6.8) mostraron su valor independiente para predecir TH (tabla 5).

Variable	Nivel de significación ( $p$ )	Hazard Ratio	IC(95%)
<b>FLIPI</b> <i>Alto riesgo vs bajo riesgo</i>	<0.001	2.6	1.5-4.5
<b>RESPUESTA A 1ª LINEA</b> <i>No respuesta &gt; Respuesta/No tto</i>	0.013	2.9	1.3-6.8

Tabla 6. Análisis multivariante de las variables que influyen en la incidencia acumulada de transformación histológica.

**CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-BIOLÓGICAS EN LA TRANSFORMACIÓN. RESPUESTA AL TRATAMIENTO**

El cuadro clínico de los casos transformados incluyó un crecimiento ganglionar en 81 pacientes (76,4%), aparición de síntomas B en 49 (46,2%), afección de sitios extraganglionares en 55 (51,9%), y aumento de la LDH en suero en 66 (62,3%) (Figura 14). Además 78 pacientes (90%) tenían un estadio de Ann Arbor de III o IV 50 casos (53%) tuvieron un R-IPI de alto riesgo.

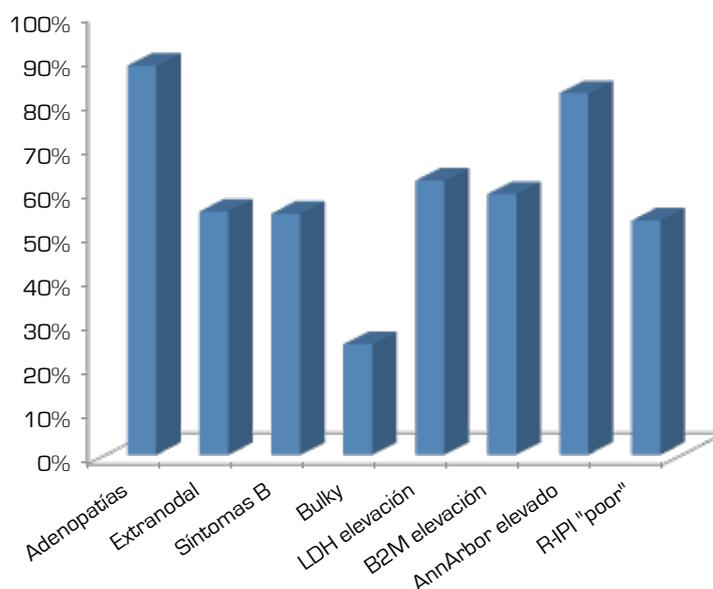


Figura 15. Características clínicas de los pacientes con TH

La mediana del número de líneas recibidas antes de la transformación fue de 2 (rango 0-7), y un 62% de ellos habían recibido rituximab en su etapa previa de LF. El tratamiento de rescate del LFt se detalla en la tabla 6. En general, el 83% de los pacientes (n = 88) recibió regímenes basados en el rituximab, siendo R-CHOP y R-ESHAP los más utilizados (34% y 32 % respectivamente). 34 pacientes alcanzaron RC (33%), 14 RP (13,6%), mientras que 54 (51%) experimentaron fracaso al tratamiento de rescate, incluyendo cinco muertes tempranas. 29 pacientes de los que alcanzaron globalmente respuesta clínica, fueron sometidos a intensificación: 22 recibieron trasplante autólogo (TASPE), mientras que siete fueron sometidos a trasplante alogénico.

## RESULTADOS. CAPÍTULO 1

<b>TRATAMIENTO</b>	<b>N=106</b>
<b>RCHOP</b>	<b>36 (34%)</b>
<b>RESHAP</b>	<b>32 (33%)</b>
<b>RGEMOX</b>	<b>13 (11%)</b>
RICE	5 (6%)
EPOCH	1 (1%)
BURKIMAB	1 (1%)
OTROS	8 (32%)
RT PALIATIVA	3 (4%)
ND/NE	8 (7%)

Tabla 7. Líneas de tratamiento de rescate recibidas en el momento de la transformación

**LA SUPERVIVENCIA DESDE LA TH (SDT): PAPEL DEL TRASPLANTE AUTÓLOGO DE PROGENITORES.**

Con una mediana de seguimiento desde la TH de 36 (1-129) meses, 70 de 106 pacientes fallecieron, con un SDT a 5 años del 26% (IC del 95%: 20-31,2). Los pacientes con R-IPI de buen o muy buen pronóstico, tuvieron una SDT a los 5 años mejor que los de R-IPI de alto riesgo (39% vs. 12%, respectivamente;  $p < 0,001$ ). Aquellos pacientes que sufrieron TH sin haber recibido tratamiento previo para su FL presentaron una tendencia hacia una mejor SDT que los tratados en la fase de LF (44% vs. 24%,  $p = ns$ ), aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas debido al bajo número de casos en el último grupo ( $n = 9$ ). Ninguna otra variable clínica evaluable en el momento de la transformación predijo mejor o peor SDT (tabla 7).

VARIABLE	P
R-IPI <i>"very good/good" &gt; "poor"</i>	<0.001
RESPUESTA AL TRATAMIENTO <i>RC &gt; RP &gt; No respuesta</i>	<0.001
AUTOTRASPLANTE <i>Si &gt; No</i>	0.007

Tabla 8. Análisis univariante de la SDT en los 106 pacientes con TH. RC: Respuesta completa; RP: Respuesta parcial.

Respecto al tratamiento del LFt, aquellos pacientes que desarrollaron transformación sin haber recibido tratamiento previo y que fueron tratados con R-CHOP después de la transformación tuvieron una mejor SDT 5 años que los que habían sido tratados previamente con R-CHOP y lo recibieron "por segunda vez" (55% vs. 33%,  $p = 0,04$ ). Por otra parte, los pacientes que alcanzaron RC con la primera línea de tratamiento en la transformación tuvieron mejor SDT a los 5 años que los que no lo hicieron (47% frente a 5%, respectivamente;  $P < 0,001$ ). Por último, los pacientes que recibieron TASPE de consolidación mostraron mejor SDT a 5 años que los que no se consolidaron (75% vs. 25%,  $p = 0,007$ ).

## RESULTADOS. CAPÍTULO 1

Sin embargo, estos dos grupos no son comparables. Aquellos pacientes que se sometieron a TASPE eran más jóvenes cuando se transformaron (58,2 años frente a 77,6 años,  $p = 0,001$ ), presentaron mejor tasa de respuestas al tratamiento de rescate para el LFt (88% vs. 29%,  $p < 0,001$ ), tuvieron mejor puntuación (buen o muy pronóstico) en la escala del R-IPI (70% vs. 38%,  $p = 0,01$ ) (Tabla 8). Para controlar este sesgo, comparamos la SDT condicionada a la consolidación con TASPE en aquellos pacientes que alcanzaron respuesta objetiva con la primera línea tras de tratamiento (de LFt). Y en este grupo, no encontramos diferencias en los 5 años SFT en aquellos que recibieron o no consolidación con TASPE (59,3% vs. 45,6%,  $p = 0,4$ , figura 15).

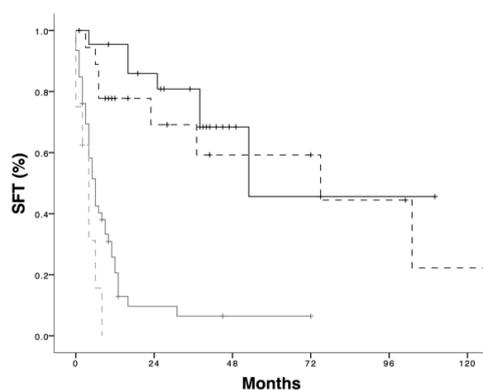


Figura 17. TASPE condicionado a respuesta a terapia de rescate en pacientes con LFt. Aquellos que alcanzaron respuesta clínica objetivable (RC+ RP) y se consolidaron con TASPE (línea negra continua), tuvieron una SDT a los 5 años de 45.6% y en los que alcanzando respuesta no recibieron TASPE de consolidación de 59.3%,  $p=0.4$ . Los pacientes refractarios recatados con QT + TASPE (línea gris continua) QT, (línea gris discontinua), tuvieron un pronóstico muy desfavorable. SFT (SDT): Survival from transformation (Supervivencia después de la transformación)

En el análisis multivariante, el R-IPI de alto riesgo (HR 3,1, IC del 95%: 1.6 a 5.7), la refractariedad a la terapia de rescate (HR 1,6, IC del 95%: 1,2-2), se asociaron de forma independiente con peor SDT a 5 años, mientras que la consolidación con TASPE tuvo un papel protector independiente en términos de SDT a 5 años (HR 0,2, 95% IC: 0,1-0,7). (Tabla 8)

VARIABLE	Nivel de significación [p]	Hazard Ratio	IC[95%]
R-IPI "Poor" vs "Good or Very Good"	<0.001	3.1	1.6-5.7
RESPUESTA No respuesta < RP < RC	<0.001	1.6	1.2-2.03
TASPE	0.007	0.2	0.1-0.7

Tabla 9. Análisis multivariante de la SDT en los 106 pacientes con TH. RC: Respuesta completa; RP: Respuesta parcial.

**LINFOMA TRANSFORMADO “de novo”, CARACTERÍSTICAS Y SUPERVIVENCIA DESDE LA TH (SDT). COMPARACIÓN CON LA SERIE DE LFT “convencionales”.**

Las variables clínicas en la transformación (FLIPI, edad, sexo, Ann-Arbor y B2 microglobulina) no fueron significativamente diferentes entre los LFT de novo y los registrados en la serie global de 1734 pacientes con LF. La SDT a los 5 años fue significativamente superior en los pacientes con LFT de novo (75% vs. 25%,  $p < 0,0001$ ; Figura 16). Las variables que influyeron en la SDT de este grupo de pacientes fueron la respuesta completa (RC) frente a no-RC con la terapia de primera línea (90% vs. 41%,  $p < 0,001$ ), y el FLIPI con puntuación de bajo riesgo (100% vs. 58%,  $p = 0,018$ ). En el análisis multivariado, sólo la RC a la terapia de primera línea (HR 6,5, IC 95%: 2,0 a 20,7) tuvo una influencia independiente sobre la SDT.

Un total de 19 pacientes con LFT de novo, no alcanzaron RC con la terapia de primera línea; recibieron terapia de rescate seguida de TASPE (como tratamiento de consolidación) en 4 casos. La SDT a 5 años del grupo que recibió TASPE fue superior (67% vs. 42%,  $p = 0,07$ ). Sin embargo, estos grupos no eran comparables ya que los pacientes con TASPE eran significativamente más jóvenes (mediana de 54 años frente 71 años,  $p = 0,031$ ).

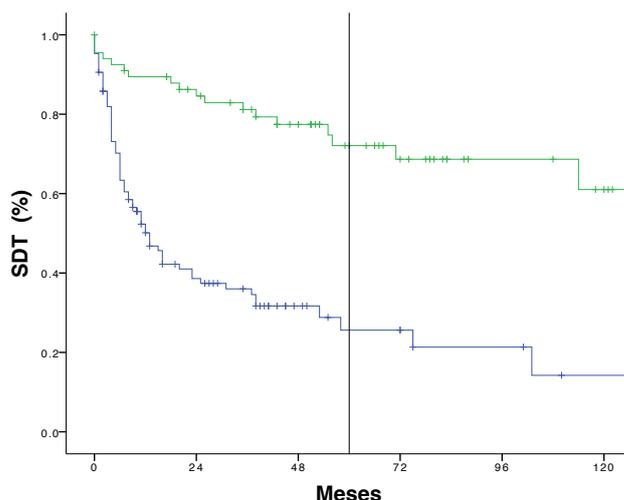


Figura 18. SDT de los pacientes con linfoma folicular transformado al diagnóstico (verde)  $n=68$ , y la SDT de los 106 pacientes con TH documentada (azul) en el seguimiento de la serie de 1734 pacientes evaluables. ( $p < 0,001$ )

### IMPACTO DE LA TRANSFORMACIÓN HISTOLÓGICA EN LA SUPERVIVENCIA DE LOS PACIENTE CON LINFOMA FOLICULAR

Se evaluó el impacto de la TH con variables tiempo dependientes e independientes, obteniéndose el mismo resultado (HR 14.4 ,  $p < 0,0001$ )

Otras variables predictoras de una menor SG, en toda la serie global de 1734 pacientes, fueron la edad avanzada , el sexo masculino , la elevación de la B2 microglobulina al diagnóstico y FLIPI alto riesgo (  $< 0,0001$  en todos los casos). El análisis multivariante se llevó a cabo incluyendo las variables mencionadas, además de la respuesta al primer tratamiento ( CR vs. no CR ) y la TH como variables dependientes del tiempo. La TH( HR 2,89 ,  $p < 0,0001$  ) fue junto con la edad ( HR 1,06 ,  $p < 0,0001$  ) , el sexo masculino ( HR 1,91 ,  $p < 0,0001$  ) , la B2M elevada ( HR 1,37;  $p = 0,022$  ) , el FLIPI de alto riesgo ( HR 1,9 ,  $p < 0,0001$  ) , y la no-RC ( HR 3,17 ,  $p < 0,0001$  ) las variables con influencia pronóstica independiente sobre la SG.

### LA SUPERVIVENCIA GLOBAL ASOCIADA A LA TRANSFORMACIÓN EN PACIENTES CON LF DE ALTO RIESGO

De la misma manera realizamos una comparación en nuestra serie inicial, seleccionando pacientes con alto riesgo de transformación.

Elegimos todos los pacientes que reuniendo las características de mal pronóstico que se asociaron a mayor riesgo de transformación en el análisis multivariante (FLIPI de alto riesgo y ausencia de respuesta al tratamiento en primera línea), presentaran (n=40) o no (n=271) transformación histológica.

Observamos que siendo ambos grupos de muy mal pronóstico, la transformación histológica definió al grupo de mayor riesgo ( $p=0.001$ ).

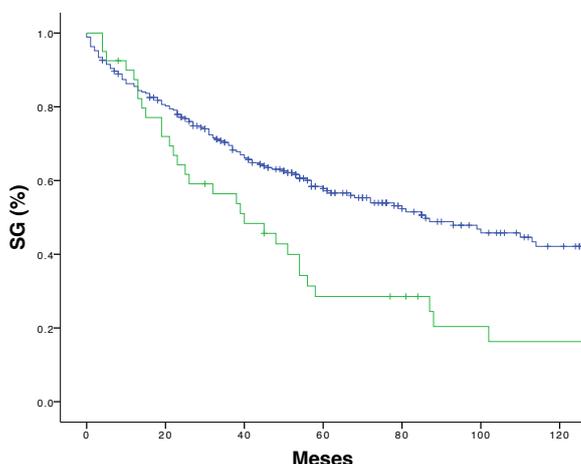


Figura 19.SG de los pacientes con linfoma folicular de alto riesgo que no experimentaron transformación (azul), n=271, y la SG de los 44 pacientes con criterios de alto riesgo que sí experimentaron TH documentada (verde) en su seguimiento. ( $p<0.001$ ).

## DISCUSIÓN

Este trabajo analiza la incidencia de TH en España, gracias a la colaboración de 18 centros integrantes del grupo GELTAMO. La calidad de las observaciones reseñadas se basa en tres aspectos:

- 1) La utilización de un criterio estricto para definir la TH, así como la selección de casos de LF que no incluyan los LF grado 3b como incluyen algunos estudios previos y excluyendo los linfomas transformados de novo, considerándolos un grupo diferente para los análisis de SDT.
- 2) La mayor parte de los pacientes fueron tratados con rituximab solo o en combinación (> 70%).
- 3) Todos los casos están recogidos de forma consecutiva en los diferentes hospitales integrantes del estudio entre 2002 y 2012. A pesar de no ser un estudio controlado, refleja con fidelidad la práctica clínica diaria, ya que no excluyeron pacientes por la estrategia terapéutica o la elegibilidad a formar parte de ensayos clínicos.

La incidencia acumulada de transformación histológica fue del 5%, 8% y 12% a los 5, 10 y 15 años, respectivamente; esta tasa es menor que las reportadas previamente<sup>34,46,125</sup> Estas diferencias podrían explicarse por los diferentes criterios considerados para el reclutamiento de pacientes en los estudios previos, así como para la definición de la transformación. Además, para el análisis estadístico de la incidencia de transformación hemos considerado la muerte de los pacientes como riesgo competitivo ya que el LF es una enfermedad de larga evolución y es preciso controlar el fallecimiento de los pacientes por otras causas, que serían censurados en un análisis convencional. El tipo de análisis, aunque no ofrece grandes variaciones, podría explicar en pequeña cantidad las diferencias observadas con respecto a otros estudios.<sup>124</sup>

En la serie más numerosa disponible hasta la fecha que ha analizado la incidencia de transformación, se observan 147/2652 (5,5%) casos de transformación documentada, aunque el estudio se realiza de forma conjunta considerando las TH y las sospechas clínicas de transformación. Esta serie tiene una mediana de seguimiento 6,8 años, por lo cual el resultado es consistente con nuestros resultados<sup>125</sup>. Aunque se ha sugerido que los

pacientes con sospecha clínica de transformación son clínicamente comparables con aquellos con confirmación histológica<sup>47</sup>, no hay evidencia suficiente para considerarlos por igual.

La incidencia de la transformación fue mayor en los pacientes con LF de alto riesgo, en consonancia con las series anteriores<sup>47</sup> incluyendo pacientes tratados con rituximab.<sup>114</sup> En nuestro estudio, un alto porcentaje de los pacientes alcanzaron RC o RCi después de la primera línea de tratamiento (74,7%). Queremos señalar la gran importancia que tiene la respuesta a la terapia de primera línea, ya que los pacientes que solo alcanzan RP, y en especial los pacientes con enfermedad refractaria se asociaron con el mayor riesgo de TH en nuestra serie.

Dado que los LFt son en su mayoría LDCBG histológicamente, se consideró incluir el R-IPi<sup>126</sup> en lugar del FLIPI como índice pronóstico para clasificar el riesgo clínico de los pacientes que alcanzaron TH. En general, la SDT a 5 años en el grupo de pacientes con TH fue baja, influenciada principalmente por el riesgo clínico establecido según el R-IPi y la respuesta a la terapia de rescate.

En particular, el R-CHOP presentó asociación con una mejor SDT en los pacientes que no lo recibieron como tratamiento de primera línea para el LF, validando resultados aportados en un trabajo<sup>47</sup> reciente.

El papel del TASPE en el LFt es incierto tras la aparición del rituximab. Principalmente por falta de estudios prospectivos aleatorizados, por lo que el nivel de evidencia disponible es bajo. Las recomendaciones recientes sugieren un papel importante del TASPE en pacientes que ya hayan sido tratados previamente para el linfoma folicular.<sup>102</sup> En nuestra serie, el TASPE se asoció con mejor SDT en la cohorte global de pacientes, algo ya descrito para la TH<sup>42</sup>, e incluyendo pacientes tratados con rituximab.<sup>47,92,125,127</sup> Sin embargo, los criterios para recibir consolidación con TASPE hacen que la elección a la hora de recibirlo o no, esté sesgada. Los pacientes trasplantados son más jóvenes y tienen mejores condiciones clínicas en el momento de la TH que los que no se trasplantan. Nuestros resultados muestran que la respuesta a la terapia de rescate es la variable que mayor grado de asociación tuvo con la SDT, por encima del TASPE y además, la respuesta condiciona la decisión de consolidar con TASPE. Si bien el TASPE se utiliza con seguridad, una respuesta completa

al tratamiento para el LFt sin consolidación posterior con TASPE, permitió alcanzar una supervivencia no inferior a los que alcanzaron RC y recibieron TASPE en nuestra serie. Debemos tener en cuenta además, que los no trasplantados tiene de por sí un peor pronóstico (edad, R-IPI). Por lo tanto, en ausencia de un estudio prospectivo en el que se comparen grupos homogéneos para el resto de variables parece difícil establecer recomendaciones claras. Como este estudio es poco probable que llegue a realizarse, la colaboración entre grupos internacionales de trabajo podría ayudar a reclutar un número significativo de pacientes para poder realizar, aunque de forma retrospectiva, todas las comparaciones necesarias limitadas en nuestra serie por el tamaño muestral.

En cuanto a los pacientes con LFt de novo, hemos podido observar parecen tener mejor pronóstico (SDT) que los pacientes que desarrollan TH después de un periodo más o menos prolongado y sometidos a tratamientos para un LF. Aunque las diferencias se observaron en términos de SDT, ambos grupos se caracterizan por una influencia decisiva de la respuesta al tratamiento de rescate/primera línea que se administra en el momento de la transformación. Curiosamente, aunque el FLIPI no es un índice estándar para evaluar el pronóstico de un linfoma agresivo, sí estratificó con precisión estos casos de LFt de novo, aunque no permitió estratificar correctamente los LFt “convencionales” . En nuestra serie, el TASPE se asoció con un beneficio (en términos de SDT/SG) en aquellos pacientes con LFt de novo que no repondían al tratamiento de primera línea.



## CAPÍTULO 2

---



CAPÍTULO 2

ESTUDIO FENOTÍPICO Y GENÉTICO DE LOS PACIENTES CON LINFOMA DIFUSO DE CÉLULAS B GRANDES Y AFECTACIÓN DE LA MO

RESULTADOS

CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES

Se incluyeron 232 pacientes con diagnóstico de LDCBG diagnosticados secuencialmente en nuestro hospital desde el 1 de enero de 1999 al 31 de diciembre de 2014. Las características clínicas de los pacientes se detallan a continuación. Se han agrupado las características por grupos, teniendo en cuenta las características del infiltrado de MO, la CO y la combinación de ambas variables.

Se observan diferencias significativas en relación a la agresividad clínica del linfoma. Los pacientes con infiltración concordante, presentan un IPI de más alto riesgo, mayor elevación de LDH, mayor número de sitios extranodales afectados. Sin embargo, las características de edad y estado general basal de los pacientes, es comparable en los tres grupos. Existen diferencias en cuanto al sexo, motivadas por mayor número de mujeres en el grupo de MO discordante. La variable sexo, no se ha relacionado de forma clásica ni en nuestra serie con variaciones en el pronóstico de los enfermos.

Variable	MO no infiltrada	MO discordante	MO concordante	<i>P</i>	CG (CO)	No-CG (CO)	<i>P</i>
Pacientes	n= 152	n= 36	n= 37	-	n= 59	n= 102	-
Sexo (V)	82 (51%)	12 (33%)	20 (54%)	<b>0.04</b>	27 (46%)	52 (51%)	0.3
Edad>60	106 (66%)	27 (75%)	20 (56%)	0.2	38 (64%)	28 (30%)	0.5
Ann Arbor >2	91 (58%)	36 (100%)	37 (100%)	<b>&lt;0.001</b>	38 (64%)	64 (63%)	0.5
IPI>2	50 (39%)	13 (43%)	23 (85%)	<b>&lt;0.001</b>	20 (38%)	45 (48%)	0.3
LDH (elevada)	50 (39%)	13 (43%)	20 (74%)	<b>&lt;0.001</b>	18 (33%)	45 (49%)	0.04
Extranodal >1	27 (20%)	15 (47%)	20 (69%)	<b>&lt;0.001</b>	15 (26%)	33 (34%)	0.2
ECOG ≥2	41 (32%)	8 (26%)	14 (52%)	0.09	20 (36%)	28 (30%)	0.3

## RESULTADOS. CAPÍTULO 2

Variable	NO CG	NO No-CG	D CG	D No-CG	C CG	C No-CG	p
<b>Pacientes</b>	n= 32	n= 64	n= 11	n= 18	n= 11	n= 20	
<b>Sexo (V)</b>	15 (47%)	38 (59%)	5 (45%)	5 (28%)	6 (55%)	9 (45%)	0.03
<b>Edad&gt;60</b>	18 (56%)	41 (64%)	10 (91%)	13 (72%)	8 (73%)	9 (45%)	0.1
<b>Ann Arbor &gt;2</b>	16 (50%)	35 (55%)	11 (100%)	18 (100%)	11 (100%)	20 (100%)	<0.001
<b>IPI&gt;2</b>	10 (31%)	21 (33%)	2 (18%)	10 (56%)	11 (100%)	14 (70%)	<0.001
<b>LDH (elevada)</b>	8 (25%)	25 (39%)	2 (18%)	8 (44%)	7 (63%)	12 (60%)	0.003
<b>Extranodal &gt;1</b>	5 (16%)	11 (17%)	4 (37%)	11 (61%)	6 (55%)	12 (60%)	<0.001
<b>ECOG ≥2</b>	10 (31%)	16 (25%)	2 (18%)	4 (22%)	6 (55%)	8 (40%)	0.08

Tabla 10. Se muestra la comparación de las variables clínicas y de la enfermedad al diagnóstico entre los diferentes grupos estudiados (atendiendo al tipo de infiltración de la MO y la CO)

### ESTUDIOS DE MÉDULA ÓSEA. ANALISIS DE LOS CASOS DISCORDANTES

#### Histología y estudio de inmunofenotipo de la MO

De la serie de 232 pacientes diagnosticados de LDCBG, se demostró infiltración de MO documentada histológicamente en 58 pacientes. De ellos, 22 pacientes tuvieron infiltrados de bajo grado, de acuerdo con las características patológicas descritas (Ver material y métodos). Otros 36 pacientes tuvieron infiltrados de alto grado en las biopsias BM. Se compararon las características histológicas de las biopsias con los datos revelados en el análisis de citometría de flujo de los aspirados, realizados en el mismo procedimiento de extacción de la biopsia.

En 34 de los 36 pacientes con infiltración por linfoma de alto grado en las biopsias, se obtuvo muestra del aspirado de sangre medular que fue analizada mediante CMF. De entre los 22 pacientes con histología de bajo grado en las biopsias, se realizó análisis inmunofenotípico en todos. Hubo una alta correlación entre los datos histológicos y el análisis por CMF. Si bien es cierto, la CMF ayudó a detectar infiltrados más tumorales que no habían sido bien identificados en las biopsias BM u ofrecían unas características

inespecíficas. En 15 pacientes, con infiltrados linfoides inespecíficos, el análisis fenotípico reveló clonalidad en los linfocitos infiltrantes. En otros, sin embargo, se confirmó un patrón policlonal considerado reactivo o inespecífico.

Además, el análisis mediante CMF permitió determinar fenotipos específicos que eran sugerentes de una amplia variedad de linfomas indolentes (Tabla 2).

Por otro lado, en 4 casos con infiltración discordante así como en 9 pacientes con infiltración por linfoma de alto grado, la infiltración del tumor no pudo ser confirmada por FCM, probablemente debido a limitaciones técnicas (aspirado seco, n=1) así como al tipo de infiltración (infiltración localizada en algunas celdillas de la biopsia n=4, infiltración intersticial n=3). En ninguno de los casos se describió un infiltrado difuso.

Para el análisis clínico, en aquellos casos con discrepancias entre la descripción patológica e inmunofenotípica, los datos histológicos determinaron la clasificación final de los pacientes.

		CMF							
		LLC	LF	LZM	LLP	LDCBG	Composit e	I	No
Histología	D	4	4	2	-	1	1	5	4
	C	-	-	-	1	21	-	-	9
	I	3	4	2	1	1	1	3	

Tabla 11. Análisis inmunofenotipo de la MO y su correlación con la histología de la BO. LLC: Leucemia linfocítica crónica; LF: Linfoma folicular; LZM: Linfoma de la zona marginal; LLP: Linfoma linfoplasmocítico; LDCBG: Linfoma difuso de células B grandes; I: Inespecífico; D: Discordante; C: Concordante

### Análisis de clonalidad

Tuvimos 15 muestras pareadas (muestra de ganglios linfático y de médula ósea) al diagnóstico en el grupo de pacientes con fenotipo discordante (histológicamente y/o fenotípicamente documentado). En 12 de ellos, el pico clonal, identificado por electroforesis capilar en ambas muestras tumorales, fue el mismo; se observaron dos picos diferentes en 1 paciente, y un patrón policlonal en otros 2 pacientes.

Hemos secuenciado los genes VDJH en estos pacientes. El gen más utilizado fue VH4.34 (n = 4), seguido de VH3.48 (n = 2), y hubo 6 pacientes que reordenaron otros genes: VH1.30, VH1.80, VH3.23, VH3.70, VH3.72 y VH4.13 (respectivamente). Todos los VH4.34 casos tenían un fenotipo centro no germinal.

### **ESTUDIOS BIOLÓGICOS DEL LDCBG**

#### **Célula de origen del LDCBG y su correlación con el tipo infiltración de MO**

No se observó ninguna relación entre la célula de origen y el tipo de infiltración en la MO (64% de los casos concordantes eran no-CG y el 62% de los casos discordantes eran centro no-CG;  $p = 1$ ). Hubo más pacientes con fenotipo no-CG en ambos grupos, pero la proporción observada en cualquiera de estos grupos no fue estadísticamente diferente al 63% de LDCBG no-CG sin infiltración de la MO ( $p = 0,98$ ).

#### **Hibridación in situ fluorescente**

Se realizó el análisis FISH en 22 pacientes, de los cuales 15 tenían infiltración concordante de MO y 7 tenían infiltración discordante. Doce eran no-CG y 10 eran GCB.

Las translocaciones de BCL2 se observaron con mayor frecuencia en los pacientes con fenotipo CG (80% en CG vs 25% en no-CG,  $p = 0,001$ ). En este grupo encontramos los casos con doble translocación MYC/BCL2 (n=2) y triples translocación MYC/BCL2/BCL6 (n=1), no presentes en los linfomas de fenotipo no-CG.

De los casos con infiltración discordante en los que se encontró la translocación IGH/BCL2 (n=4), en 3 de ellos la CMF había descrito un fenotipo compatible con LF, mientras en el cuarto el fenotipo fue inespecífico. Por contra, en los 3 casos en los que la MO fue discordante y no se detectó la translocación el fenotipo fue, según la CMF, compatible con: LLC, linfoma composite y fenotipo inespecífico.

Observamos 4 casos con delección de TP53. Tres eran no-CG y 1 era CG. De hecho, este paciente fue el único paciente con MO discordante y CO CG que progresó de aquellos en los que pudimos realizar estudios de FISH; este paciente asoció la BCL2/CMYC y la delección de TP53, que sin duda

RESULTADOS. CAPÍTULO 2

influyeron en se evolución desfavorable. En el grupo con infiltración concordante y CG, 13/15 pacientes a quienes se realizó FISH mostraron aberraciones en uno o más de los genes estudiados.

Muestra	(14;18)(32;2) (IGH/BCL2)	8q24 (MYC)	3q26 (BCL6)	17p13.1 (TP53)	CO	MO
GL	Positivo	Positivo	Positivo	N	CG	Conc
GL	Positivo	N	N	N	CG	Conc
MO	18q21 gan	N	N	N	CG	Conc
GL	Positivo	N	N	N	CG	Conc
MO	Positivo	N	3q26 gan	N	CG	Conc
GL	Positivo	Positivo	N	N	CG	Conc
MO	18q21 gan	N	N	N	NO-	Conc
GL	Positivo	Positivo	Positivo	Dele	NO-	Conc
GL	N	N	N	N	NO-	Conc
GL	Positivo	Positivo	Positivo	Dele	NO-	Conc
GL	N	Positivo	N		NO-	Conc
GL	18q21 gan	N	NA	N	NO-	Conc
MO	N	N	N	N	NO-	Conc
MO	N	N	N	N	NO-	Conc
GL	18q21 gan	Positivo	N		NO-	Conc
GL	Positivo	8q24 gan	N	N	CG	Disc
GL	Positivo	N	Positivo	N	CG	Disc
GL	N	8q24 gan	3q26 gan	N	CG	Disc
GL	Positivo	Positivo	3q26 gan	Dele	CG	Disc
GL	N	N	N	N	NO-	Disc
GL	Positivo	N	N	N	NO-	Disc
GL	18q21 gan	8q24 gan	3q26 gan	Dele	NO- CG	Disc

Tabla 12. Alteraciones genéticas (FISH) en las muestras de LDCBG en los distintos grupos de pacientes. GL: ganglio linfático; MO: médula ósea; N: Normal; Gan: Ganancias; Dele: Delección; Conc: Concordante; Disc: Discordante

### ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA

Estos análisis se realizaron sólo entre los 189 pacientes tratados con rituximab + quimioterapia con intención curativa. La mediana de seguimiento fue de 58 meses (0-152).

#### Análisis de supervivencia según el tipo de infiltración en MO

Supervivencia libre de progresión [SLP]

La SLP a los 5 años fue del 67,8% para el grupo sin infiltración de MO, 64,8% para el grupo con infiltración discordante ( $p = 0,2$ ) y 30,4% para el grupo concordante ( $p < 0,001$ )

En el grupo discordante 7 de los 28 pacientes incluidos en el análisis de supervivencia, presentaron recaída después de una remisión completa con terapia de primera línea: 5 pacientes recayeron con histología de linfoma de alto grado y 2 pacientes con linfoma de bajo grado. En el análisis multivariado la infiltración concordante tuvo factor pronóstico independiente sobre SLP, y este impacto mantuvo su independencia, tanto teniendo en cuenta a la puntuación del IPI (como una variable cuantitativa y continua) como al introducir las variables contenidas en el IPI por separado. La razón de riesgo (HR) de la infiltración concordante en MO fue de 2,5; IC del 95%: 1,2 a 5;  $p = 0,01$ .

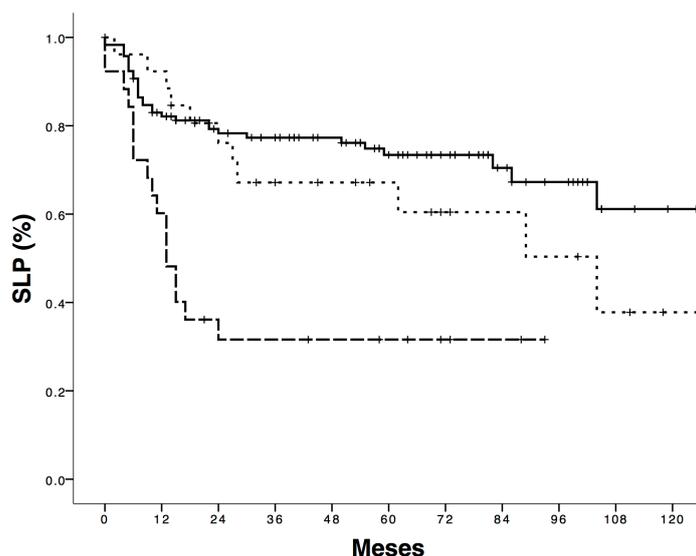


Figura 19. SLP de los pacientes sin infiltración de MO (línea negra continua), con infiltración discordante (línea de puntos) e infiltración concordante (línea discontinua).

SLP			SG		
HR	IC (95%)	<i>p</i>	HR	IC (95%)	<i>p</i>
2.5	1.2-5	0.01	1.6	0.7-3.4	0.2
1.5	0.7-3	0.2	1.5	0.7-3.2	0.3
0.6	0.3-1.2	0.1	0.6	0.3-1.2	0.1
1.2	0.9-1.5	0.07	1.4	1.1-1.8	0.004

Tabla 14. Se muestra el análisis multivariante para SLP y SG. La MO concordante y el IPI muestran el mayor impacto pronóstico independiente para SLP. Sólo la infiltración concordante de la MO tiene impacto pronóstico independiente para SG

Supervivencia global

Los pacientes con MO concordante tuvieron una SG disminuido (52,8% a los 5 años) en comparación con el grupo sin infiltración (72,5% a los 5 años),  $p = 0,08$ . Para los pacientes con MO discordante, la SG a los 5 años fue del 71,3%, no significativamente diferente de la de los pacientes sin infiltración de MO ( $p = 0,6$ ).

En el análisis multivariante, la única variable con impacto independiente fue el IPI.

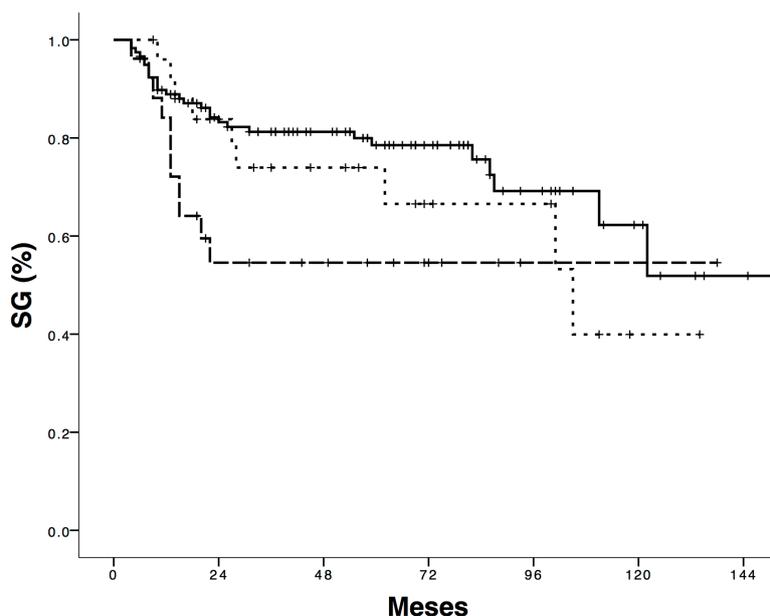


Figura 20. SG de los pacientes sin infiltración de MO (línea negra continua), con infiltración discordante (línea de puntos) e infiltración concordante (línea discontinua).

**Análisis de supervivencia de acuerdo con la células de origen**

Dividimos los pacientes en 6 grupos de acuerdo con la CO y el tipo de infiltración de MO: concordantes y no CG (n = 16), concordantes y GC (n = 6), discordantes y no CG (n = 14), discordantes y CG (n = 9) y, finalmente, aquellos sin infiltración de MO, CG (n = 32) y no-CG (n = 64).

Supervivencia libre de progresión

Hemos observado que tanto los pacientes concordantes no-CG como CG tenían peor SLP (33,3% y 25% a los 5 años, respectivamente) en comparación con el grupo sin infiltración tipo CG (78%), al grupo sin infiltración tipo no-CG (70% ) y también en comparación con el grupo con infiltración discordante CG;  $p < 0.05$  para todas las comparaciones (Ver Tabla 5A). Para el análisis multivariante, consideramos los dos grupos sin infiltración como un solo grupo contra el que se compararon las otras 4 variables. Los grupos de infiltración concordante CG y no-CG mantuvieron su impacto pronóstico independiente para la SLP al enfrentarse con el IPI. La HR para los concordantes CG fue de 2,9; IC del 95%: 1 a 8,7 ( $p = 0,04$ ) y para los pacientes con MO concordante tipo no-CGF fue de 3; IC del 95%: 1,4 a 6,4 ( $p = 0,003$ ).

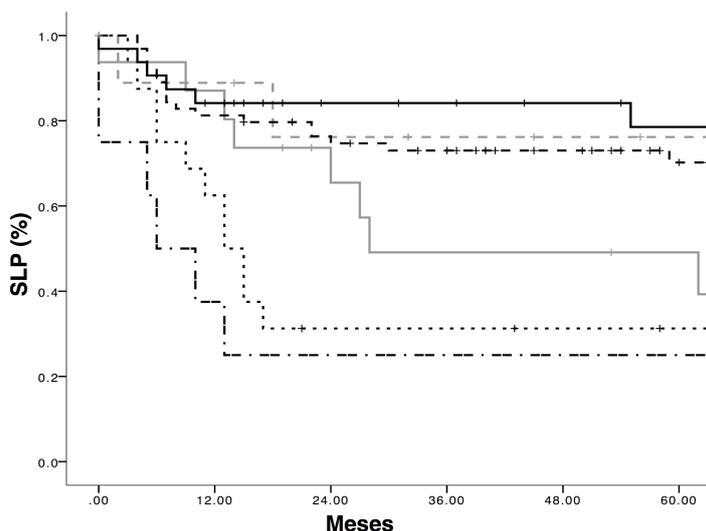


Figura 21 SLP de los pacientes sin infiltración de MO y CO tipo CG (línea continua negra), sin infiltración, no-CG (discontinua negra), con MO discordante y CO tipo CG (gris discontinua), discordante no-CG (continua gris), concordante no-CG (línea negra de rayas y puntos) y discordante CG (línea negra de puntos)

RESULTADOS. CAPÍTULO 2

Variables	SLP 5 años	p
<b>Infiltración MO +CO</b>		
C + CG vs NO + CG	25% vs 78.5%	0.001
C + CG vs NO + No-CG	25% vs 73%	0.001
C + No-CG vs NO + CG	31.3% vs 78.5%	0.001
C + No-CG vs NO + No-CG	31.3% vs 73%	0.002
D + CG vs NO + CG	76.2% vs 78.5%	0.8
D + CG vs NO + No-CG	76.2% vs 73%	0.7
D + No-CG vs NO + CG	49.1% vs 78.5%	0.007
D + No-CG vs NO + No-CG	49.1% vs 73%	0.05
Variables	SLP	
	HR	IC (95%)
<b>Infiltración MO +CO</b>		
C + CG vs No	2.9	1-8.7
C+ No-CG vs No	3	1.4-6.4
D+ CG vs No	0.7	0.1-3
D+ No-CG vs No	1.9	0.9-4.2
<b>IPI score</b>	1.2	0.9-1.5
		0.1

Tabla 14. Se muestra el análisis multivariante para SLP en función de la CO y el tipo de infiltración.

Supervivencia global

Tanto los pacientes con MO concordante y CO tipo CG como los pacientes concordantes no-CG tuvieron una SG disminuida en el análisis univariante (55,6% y 44,4% a los 5 años, respectivamente) en comparación con los pacientes sin infiltración de la MO, tanto no-CG como CG (75% y 80% respectivamente). Aunque su impacto no mostró factor pronóstico independiente al compararse con el IPI (puntuación total o considerando sus variables por separado) en el análisis multivariado.

Sorprendentemente, a pesar de que no habíamos encontrado diferencias de supervivencia para el grupo de pacientes con MO discordante, los pacientes que se tenían la combinación de MO discordante CO tipo no-CG tuvieron SLP y la SG a los 5 años significativamente disminuidas (52,4 y 63,5%) en comparación con los pacientes sin infiltración de la MO ( $p < 0.05$  para todas las comparaciones). Esta categoría se mantuvo cerca de la significación en el análisis multivariante para tener una influencia independiente en SLP; HR 1,9; IC del 95%: 0,9 a 4,2 ( $p = 0,08$ ). En el análisis multivariante para SG, tampoco mostró independencia del IPI.

RESULTADOS. CAPÍTULO 2

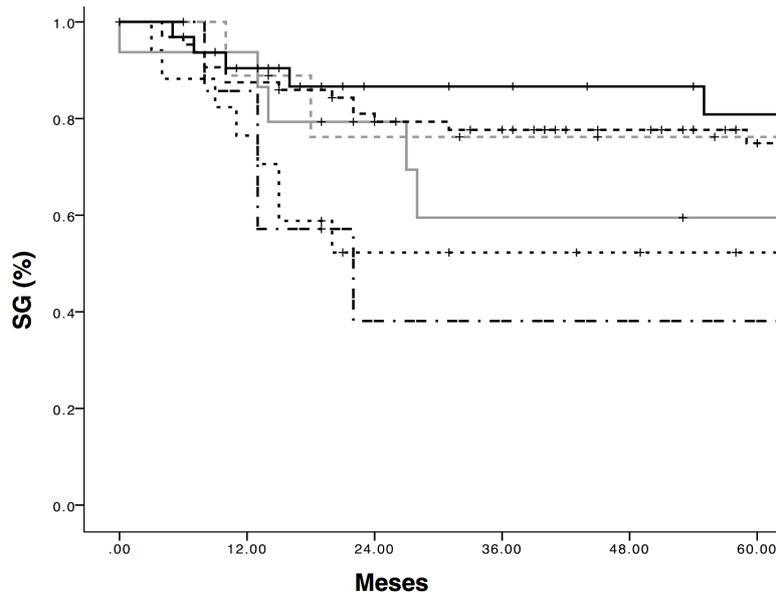


Figura 22. SG de los pacientes sin infiltración de MO y CO tipo CG (línea continua negra), sin infiltración, no-CG (discontinua negra), con MO discordante y CO tipo CG (gris discontinua), discordante no-CG (continua gris), concordante no-CG (línea negra de rayas y puntos) y discordante CG (línea negra de puntos)

Variables	SG 5 años		<i>p</i>
<b>Infiltración MO +CO</b>			
C + CG vs NO + CG	38.1% vs 80.9%		0.02
C + CG vs NO + No-CG	38.1% vs 74.9%		0.07
C + No-CG vs NO + CG	52.3% vs 80.9%		0.02
C + No-CG vs NO + No-CG	52.3 vs 74.9%		0.04
D + CG vs NO + CG	76.2% vs 80.9%		0.7
D + CG vs NO + No-CG	76.2% vs 74.9%		0.9
D + No-CG vs NO + CG	59.5% vs 80.9%		0.01
D + No-CG vs NO + No-CG	59.5 %vs 74.9%		0.09
<b>Variables</b>			
<b>SG</b>			
	<b>HR</b>	<b>IC (95%)</b>	<b><i>p</i></b>
<b>Infiltración MO +CO</b>			
C + CG vs No	1.2	0.3-4.4	0.2
C+ No-CG vs No	1.6	0.7-3.9	0.3
D+ CG vs No	0.7	0.1-3.4	0.7
D+ No-CG vs No	1.6	0.6-3.7	0.3
<b>IPI score</b>	1.5	1.2-1.9	<0.001

Tabla 15. Se muestra el análisis multivariante para SG en función de la CO y el tipo de infiltración de MO.



DISCUSIÓN

Los estudios previos en relación al tipo de infiltración de MO y su pronóstico, son concluyentes en cuanto a la infiltración concordante, pero no lo son en el grupo de infiltración discordante como se observa en esta tabla:

Autores	Número total /C/D	NI vs D		Ni vs C		Mult-variante	
		SLP SG	p valor	SLP SG	p valor	SLP SG (HR; CI95%)	R
<b>Hodges<sup>27</sup> (1994)</b>	59/6/14* * <i>small cleaved cells</i>	49% vs 47%	ns	49% vs 13%	- <0.05		<b>No</b>
<b>Robertson<sup>28</sup> (1991)</b>	0/24*/19 * <i>large cell lymphoma cells</i>	Concordante vs Discordante <12% vs 30% (5a) 12% vs 79% (5a)			- 0.002		<b>No</b>
<b>Kremer<sup>29</sup> (2003)</b>	21/0/21* * <i>large cell infiltrates</i>				-		<b>No</b>
<b>Campbell<sup>128</sup> (2006)</b>	172/13/34* * = <50% células grandes	50% vs 22% (3a) 60% vs 30% (3a)		50% vs 18% (aprox) (3a) 60% vs 25% (aprox) (3a)		C VS D 2.07; (0.9-4.9)	<b>No</b>
<b>Chung<sup>129</sup> (2007)</b>	489/29/26* * <5 large, non-cleaved cells per high-power field.	61.5% vs 46.9%	ns	10.3% vs 46.9% (5 a)	0.001	C VS NI 1.87 1.25-2.81	<b>No</b>
<b>Sehn<sup>38</sup> (2011)</b>	795/67/58* * <i>marrow involvement with DLBCL</i>	73% vs 57% (3a) 78% vs 69% (3a)	0.019 0.2	73% vs 37% (3a) 78% vs 49% (3a)	0.001 0.001	C VS NI 2.0; 1.4 - 2.8 1.7; 1.1 - 2.5	<b>Si</b>
<b>Chigrinova<sup>130</sup> (2011)</b>	133/18*/9 * <i>large CD20+ cells</i>	80% vs 100% (5a) 80% vs 100% (5a)		80% vs 0% (5a) 80% vs 0% (5a)	<0.001 <0.001		<b>Si</b>
<b>Shim<sup>131</sup> (2013)</b>	632/48/32	69.1% vs 57.1% (3a) 73.5% vs 64.2% (3a)	<0.001 0.3	69.1% vs 29.6% (3a) 73.5% vs 38.5% (3a)	<0.001 0.3	C VS NI 1.98; 1.3 - 3.0 1.76; 1.1 - 2.7 D VS NI 1.21; 0.7 - 2.4 1.35; 0.7 - 2.8	<b>Si</b>
<b>Park<sup>132</sup> (2015)</b>	152/15/11* * <5 large, non-cleaved cells per high-power field.	80% vs 40% (2a) 80% vs 65% (2a)	<0.001 0.07	80% vs 20% (2 a) 80% vs 35% (aprox) (2a)	<0.001 <0.001	C VS NI 5.2; 2.2 - 12.2; 0.001 3.9; 1.6 - 9.4; 0.002 D VS NI 3.5; 1.3 to 9.3; 0.012 3.5; 1.3 to 9.5;	<b>Si</b>

Tabla 16. Comparación de los estudios realizados hasta la fecha que analizan el valor de la histología de la MO en los pacientes con LDCBG. SLP: Supervivencia libre de progresión; SG:Supervivencia global; D:Discordante; C: Concordante; NI: No infiltración de médula ósea.

En este estudio hemos observado que la infiltración de la médula ósea por linfoma de alto grado en pacientes con LDCBG, implica un pronóstico desfavorable. Esta influencia, en nuestra serie, fue independiente del R-IPI y de la CO del LDCBG en cuanto a la SLP. Aunque la SG también se vio disminuida en este grupo de pacientes en el análisis univariado, esta influencia no tuvo un impacto independiente en el análisis multivariante. Probablemente, esto es debido a la eficacia de las terapias de rescate empleadas, incluidos el trasplante autólogo y alogénico de progenitores hematopoyéticos.

En cuanto al grupo de pacientes con MO discordante, hemos documentado características biológicas que podrían explicar las diferencias pronósticas descritas en las diferentes series. En primer lugar, hemos observado que aunque la CO no está relacionada con el tipo de infiltración, cuando se combina con el tipo de infiltración de la MO, se pueden subestratificar grupos de riesgo. Los pacientes que tienen MO discordante y un LDCBG de tipo no-CG ven disminuida significativamente la SLP, y como ocurre con la infiltración concordante, es independiente del IPI. Sin embargo, los pacientes con MO discordante y LDCBG de fenotipo CG tienen resultados similares a los que no tienen infiltración de la MO. Estas diferencias clínicas, junto con la ya descrita tendencia a una mayor infiltración del SNC en el caso de los casos concordantes, deberían ayudar a perfilar la intensidad del tratamiento.<sup>38</sup>

En segundo lugar, hemos observado, confirmando estudios anteriores<sup>39</sup> que la CMF es de ayuda tanto para definir el tipo de linfoma de bajo grado observado en la MO, como para mejorar la sensibilidad de las técnicas histológicas para detectar la infiltración de la MO. Algunos grupos han sugerido que la biopsia ósea es una técnica diagnóstica que carece de la sensibilidad necesaria para detectar la infiltración de la MO<sup>128</sup> sobre todo hoy en día, cuando la biopsia bicrestal no se realiza con frecuencia, como sucede en nuestra serie. Además, las investigaciones recientes sugieren que la CMF del aspirado podría ser más útil que el la biopsia para detectar infiltración<sup>128</sup>. En nuestra serie, confirmamos el beneficio de la CMF para la descripción y análisis de clonalidad de patrones histológicos inespecíficos de infiltración, en los que el patólogo no puede confirmar características malignas con seguridad, así

como para la caracterización de los casos discordantes. Los estudios futuros que incluyan más casos permitirán demostrar de forma prospectiva el verdadero beneficio de la adición de la CMF a las técnicas histológicas de forma rutinaria.

En tercer lugar, los estudios de clonalidad que han analizado la relación entre el linfoma de bajo grado y el de alto grado en pacientes con MO discordante demostraron una alta tasa de identidad clonal, algo superior a la descrita en otros estudios.<sup>39</sup> Estos casos podrían corresponder a casos de transformación. Sin embargo, el análisis genómico de este grupo de pacientes permitirá conocer si los mecanismos de evolución clonal en este grupo de pacientes son los mismos que los observados en las transformaciones documentadas en el tiempo de linfomas indolentes.

Por último, los estudios de FISH han permitido comprender algunos de los mecanismos que podrían estar implicados en la infiltración de alto grado de la MO.

Hemos documentado una llamativa presencia de translocaciones (14;18), que afectan al gen BCL2 en el grupo de pacientes con infiltración de MO, en el grupo con CO de fenotipo CG (80%),  $p = 0,001$  (vs el 8% observado en el grupo no-CG). Esta traslocación aparece en el 18-20% de los LDCBG<sup>129,130</sup> y hasta en el 18-35% si consideramos solo el grupo de LDCBG con fenotipo CG, grupo en el que es característica<sup>131</sup> en cualquier caso, inferior a la registrada en este grupo con infiltración de MO.<sup>132,133</sup> Además de esta observación, hemos comprobado que de los 4 pacientes con infiltrado discordante en MO con traslocación 14;18, 3 tenían, por CMF, fenotipo de linfoma folicular y un cuarto tenía fenotipo inespecífico. De los 3 pacientes con MO discordante, sin traslocación 14;18, el fenotipo fue compatible respectivamente con: LLC, linfoma composite y linfoma de fenotipo inespecífico/marginal. Es intrigante la presencia de esta traslocación en linfomas de carácter agresivo. Algunos, como se ha comentado, es probable que estén relacionados (probables casos de transformación) con un clon de linfoma folicular en la MO, lo que justificaría este hallazgo. Sin embargo, en aquellos con infiltración por linfoma agresivo en ambas localizaciones (entendiendo que estos datos deben ser interpretados con prudencia por tratarse de un tamaño muestral pequeño) la elevada frecuencia de la

traslocación debe ser, al menos, mencionada e interpretada para ser tenida en cuenta en estudios prospectivos. La función que ejerce la traslocación de BCL2 en ambas situaciones (MO de bajo y alto grado), cabría pensar que es la misma, ya que habitualmente en los linfomas asumimos un papel antiapoptótico de esta proteína. Pero no podemos olvidar que BCL2 ejerce otras funciones. Actúa sobre el ciclo celular, induciendo la quiescencia e incluso senescencia celular, y así se ha demostrado en algunos modelos tumorales<sup>134,135</sup>. El aprendizaje de si la adquisición de esta mutación tiene lugar en un etapa previa en la MO en todos los casos y si otorga al clon celular un carácter antiapoptótico o tal vez un estado de quiescencia y por ende resistencia a los efectos antiproliferativos de la quimioterapia actual, podría ser un punto de interés a abordar en estudios futuros.

La doble traslocación *BCL2/CMYC* sólo se observó en el grupo de pacientes con fenotipo CG, de acuerdo a lo descrito por otros grupos. Las ganancias de *CMYC* fueron frecuentes, pero su interpretación clínica sigue siendo controvertida.<sup>136-138</sup> La pérdida de *TP53*<sup>139</sup>, de conocido pronóstico adverso, apareció en 4 pacientes de los 22 pacientes con MO afectada a los que se les hizo FISH en los que se observó un pronóstico desfavorable. Tres de ellos pertenecían a los grupos antes descritos de mal pronóstico clínico: 2 eran concordantes tipo no-CG y 1 discordante tipo no-CG. Sólo uno fue la excepción, encontrándose en el grupo de pacientes con fenotipo CG y afectación de MO discordante. Curiosamente, este paciente fue el único con estas características de CO y afectación de MO en los que se hizo FISH que progresó. Lo que nos permite comprender que la integración de todas las técnicas diagnósticas es imprescindible para conocer la evolución biológica y clínica de nuestros pacientes.

Finalmente, aunque las exploraciones PET / CT han demostrado una alta sensibilidad para detectar la infiltración de MO<sup>140</sup>, la sensibilidad de esta técnica para infiltrados de bajo grado, metabólicamente menos activos, no está tan clara<sup>141</sup>. Los resultados expuestos hacen referencia a la importancia del tipo de infiltrado, y a su interpretación conjunta con el resto de características biológicas del LDCBG (CO, alteraciones genéticas); según nuestros resultados, no debemos prescindir de estos datos. Al menos, hasta que sea posible tener esta información utilizando otras técnicas.



## CAPÍTULO 3

---



CAPÍTULO 3

**ESTUDIO GENÉTICO (EXOMA) DE LOS PACIENTES CON LINFOMA LINFOPLASMOCÍTICO QUE EXPERIMENTAN TRANSFORMACIÓN A LINFOMA DE ALTO GRADO**

**RESULTADOS**

**IDENTIFICACIÓN DEL PERFIL MUTACIONAL A LO LARGO DE LA EVOLUCIÓN DE LA MW HACIA LDCBG EN LOS DISTINTOS PACIENTES**

Se expondrán las características clínicas que presentaba cada paciente en los diferentes estadios evolutivos de la enfermedad, junto con las alteraciones histológicas y fenotípicas. Posteriormente, para cada paciente, se nombrarán las mutaciones halladas en los diferentes momentos evolutivos de la enfermedad, refiriendo para cada muestra tumoral el porcentaje de infiltración determinado mediante citometría de flujo. Para cada paciente existe una muestra de ADN no tumora, y muestra tumoral al diagnóstico y en la transformación (pacientes 1, 2 y 5). En el paciente 3 sólo existe muestra tumoral en la transformación. Además, en el paciente 2 se refieren datos de una recaída intermedia (entre el diagnóstico y la transformación).

**Paciente 1. Características clínicas y mutaciones somáticas en la evolución**

Características clínicas al diagnóstico 2009		
CMF	AP	Datos clínicos
AMO: 12% infiltración MW. CD19+ CD79B+ cIgM++ CD27- CD38- CD45+ CD22+ CD25d CD81+ CD45++	BMO: Infiltración MW. Grandes agregados, peritrabeculares. Citogenética: No hecha FISH: Deleción 6q (65%) Resto de sondas estudiadas (CMYC break apart): normal.	62 años Anemia, poliadenopatías, CM= 1.5 g/dl 1ª línea R-VD. 2ª línea marzo 2011 FC (adenopatías, CM, anemia).
Características clínicas en la transformación 2012		
PAAF bazo: 40% LNH, gran tamaño CD200+ CD43- IGM+ CD31- LAIR1- CD81+ CD95- CXCR5- CD49D- CD62L- CD39- CD27- DR+ 0.11%	Biopsia de pieza de esplenectomía: infiltración por LDCBG.	65 años
AMO: 5% infiltración LDCBG.		
AMO: Aspirado de médula ósea; BMO: Biopsia de médula ósea; R-VD: Rituximab, bortezomid, dexametasona, FC: Fludarabina, ciclofosfamida.; LAN: Límite alto de la normalidad		

Tabla 17. Características del paciente 1.

RESULTADOS. CAPÍTULO 3

Mutaciones somáticas	Frecuencia (%) Diagnóstico (12% infiltración)	Frecuencia (%) Transformación (40% infiltración)
<i>MYD88</i> c.794T>C	6%	61%
<i>STK11</i> c.1290C>A	6%	
<i>PLD2</i> c.854C>A	6%	
<i>UNC93B1</i> c.131A>C		37%
<i>ETV6</i> c.328+1G>C		34%
<i>TP53</i> c.632C>T		26%
<i>PRDM1</i> c.520G>C		26%
<i>KIT</i> c.1394C>T		21%
<i>HDAC9</i> c.1988G>A		19%
<i>MLLT3 (AF9)</i> c.954_957delCACT (frameshit)		10%
<i>KMT2C</i> c.2263C>T (stop)		6%
<i>KMT2C</i> c.2189C>A		3%
<i>KMT2C</i> c.14707G>T		3%
<i>KMT2D</i> c.706G>T		3%
<i>PIM1</i> c.72G>T		34%
<i>PIM1</i> c.3G>A (primera metionina)		31%
<i>PIM1</i> c.73C>G		19%
<i>PIM1</i> c.544C>G		18%
<i>PIM1</i> c.550C>T		14%
<i>PIM1</i> c.385C>T		17%
<i>PIM1</i> c.346T>G		16%
<i>PIM1</i> c.110A>C		16%
<i>PIM1</i> c.373C>T		16%
<i>PIM1</i> c.109C>T		12%
<i>PIM1</i> c.149G>A		12%
<i>PIM1</i> c.241C>T		11%
<i>PIM1</i> c.164G>A		9%
<i>PIM1</i> c.437G>A		8%
<i>PIM1</i> c.403G>T (stop)		6%

Tabla 18. Perfil mutacional del paciente 1.

**Paciente 2. Características clínicas y mutaciones somáticas en la evolución**

Características clínicas al diagnóstico 2010		
CMF	AP	Datos clínicos
AMO: 22% infiltración MW kappa.	BMO: Infiltración intersticial difusa, compatible con MW/linfoma de grado bajo.	82 años. Anemia <10 g/dl. CM= 3 g/dl 1ª línea con: CRD (6 ciclos) → MBRP (inmunofijación positiva)
Características clínicas en la recaída 2013		
AMO: 70% infiltración MW.	BMO: Infiltración por LDCBG.	85 años. Anemia + trombopenia 2ª línea con FC (3 ciclos) → NR 3ª línea: R-Bendamustina (5 ciclos) → MBRP. 4ª línea (Abril 2015): R-VD
Características clínicas en la transformación 2015		
PAAF adenopatía: 50% LNH Kappa tamaño grande	Biopsia de adenopatía: Infiltración por LDCBG.CD10 -, bcl6 +, MUM.1 +, bcl2 + (80%), C-MYC + (20%), ki67 >70%. FISH: CMYC break apart: Ganancias 60% de las células.	87 años. Adenomegalias inguinales. LDH 2xLAN. CM estable 5ª línea (1ª LDCBG): Gemcitabina + Oxaliplatino + Dexametasona como uso compasivo.
AMO: Aspirado de médula ósea; BMO: Biopsia de médula ósea; CRD: Ciclofosfamida, rituximab; dexametasona; R-VD: Rituximab, bortezomid, dexametasona; FC: Fludarabina, ciclofosfamida; CM:Componente monoclonal; MBRP: Muy buena respuesta parcial; LAN: Límite alto de la normalidad		

Tabla 19. Características del paciente 2.

Mutaciones somáticas	Frecuencia (%) Diagnóstico (12% infiltración)	Frecuencia (%) Recaída (70% infiltración)	Frecuencia (%) Transformación (40% infiltración)
<b>MYD88</b> c.794T>C	19%	73%	48%
<b>CD79B</b> c.587A>G	14%	34%	17%
<b>MECOM/ETV6</b> c.928G>A	13%	41%	17%
<b>KMT2D</b> c.15120delC (frameshift)	11%	34%	22%
<b>BIRC6</b> c.7139T>C	10%	32%	18%
<b>PPRC1</b> c.3979C> (stop)	16%	27%	20%
<b>WT1</b> c.501_502 AAAATCTCTTGTA	9%	15%	12%
<b>FAM135B</b> c.603A>T		50%	30%
<b>RAD51C</b> c.311G>A		35%	21%
<b>PPM1D</b> c.1280G>A		26%	21%
<b>TRAPPC9</b> c.2707C>A		14%	12%
<b>SBF2</b> c.5359G>A		11%	11%
<b>TP53</b> c.586C>T (stop)		19%	
<b>FLT4</b> c.209C>G		25%	
<b>TBL1XR1</b> c.740G>A		22%	
<b>HOXA3</b> c.207G>C		17%	
<b>KMT2D</b> c.9459delG (framsehift)			13%
<b>FSD1</b> c.994C>T			17%
<b>BTG1</b> c.128G>A			13%

Tabla 20. Perfil mutacional del paciente 2.

RESULTADOS. CAPÍTULO 3

Paciente 3. Características clínicas y mutaciones somáticas en la evolución

Características clínica al diagnóstico 2003		
CMF	AP	Datos clínicos
AMO: 16% infiltración MW.	BMO: MW. Afectación nódulo intersticial.	81 años Hiperviscosidad CM= 4 g/dl. 1ª línea: Plasmaféresis
Características clínicas en la transformación 2006		
CMF	AP	Datos clínicos
AMO: 8% linfoplasmoci tos y 8% linfocitos clonales de gran tamaño.	Citología de MO: 8% de blastos grandes con vacuolas citoplasma basofilo y amplio. BMO: LDCBG. Citogenética de la biopsia de MO: 50,XY,+X,+3,+der(5p),-6,+13,+14 cp5 FISH: 6q-, 14q normal.	85 años Síntomas B. CM estable. LDH x5LAN Anemia y trombopenia Paliativa. Fallece en agosto de 2006.
AMO: Aspirado de médula ósea; BMO: Biopsia de médula ósea; CM:Componente monoclonal; LAN: Límite alto de la normalidad		

Tabla 21. Características del paciente 3.

Mutaciones somáticas	Frecuencia (%) Transformación (8+8*% infiltración)
<i>MYD88</i> c.794T>C	16%
<i>PIM1</i> c.550C>T	9%
<i>PIM1</i> c.403G>T (stop)	9%
<i>PIM1</i> c.248G>A	6%
<i>PIM1</i> c.413C>T	5%
<i>KMT2D</i> c.9835C>T	8%
<i>KMT2C</i> c.5053G>	7%
<i>KMT2C</i> c.1139G>T	7%
<i>KMT2C</i> c.1173C>A (stop)	6%
<i>CD79B</i> c.586T>C	6%
<i>PRDM1</i> c.284G>C	6%
<i>PRDM1</i> c291+1G>A (Canonical, splicing)	5%
<i>TET2</i> c.507dupT (frameshift)	10%
<i>B2M/PATL2</i> c.67+1G>A	6%

Tabla 22. Perfil mutacional del paciente 3.

**Paciente 5. Características clínicas y mutaciones somáticas en la evolución**

Características clínicas al diagnóstico 2002		
CMF	AP	Datos clínicos
AMO: 11% infiltración por MW. CD19+, CD22+, CD23 -/+, FMC+d, Lambda, CD5-, CD10-, CD25+, CD11c-, CD10-	BMO: Infiltrado linfocito intersticial (linfocitos y algunas plasmáticas, ocasionalmente con inclusiones intranucleares).	72 años CM= 1 g/dl Observación
Características clínicas en la transformación 2015		
CMF	AP	Datos clínicos
AMO: 43% infiltración por MW y 11% de células B tumorales con fenotipo LDCBG. CD19+d, CD20+, slg-, CD38/+d, CD10-, CD45+, CD5-, TdT-, CD34-, HLADR++.	BMO: LDCBG. FISH: <i>CMYC</i> break apart: Normal	85 años Síntomas B, anemia y trombopenia. CM= 1.5, LDH 6XLAN 1ª línea: R-miniCOP (4 ciclos) Sepsis octubre 2015, exitus.
AMO: Aspirado de médula ósea; BMO: Biopsia de médula ósea; CM: Componente monoclonal; LAN: Límite alto de la normalidad; R-miniCOP: Rituximab, dosis reducidas de ciclofosfamida, vincristina, prednisona.		

Tabla 23. Características del paciente 5.

Mutaciones somáticas	Frecuencia (%) Diagnóstico (11% infiltración)	Frecuencia (%) Transformación (40% + 11% infiltración)
<i>MYD88</i> c.794T>C	9%	22%
<i>CD79B</i> c.586T>C	9%	22%
<i>CXCR4</i> c.1006G>T (stop)	8%	22%
<i>KLF2</i> c.824G>A	9%	22%
<i>CALML3</i> c.320G>A	8%	22%
<i>UCMA</i> c.33C>A	8%	22%
<i>UBR5</i> c.4024A>G	8%	22%
<i>MOS</i> c.1001T>A	6%	22%
<i>KMT2D</i> c.3695C>T		5%

Tabla 24. Perfil mutacional del paciente 5.

**INTERPRETACIÓN Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS**  
**PATRON DE EVOLUCIÓN CLONAL**

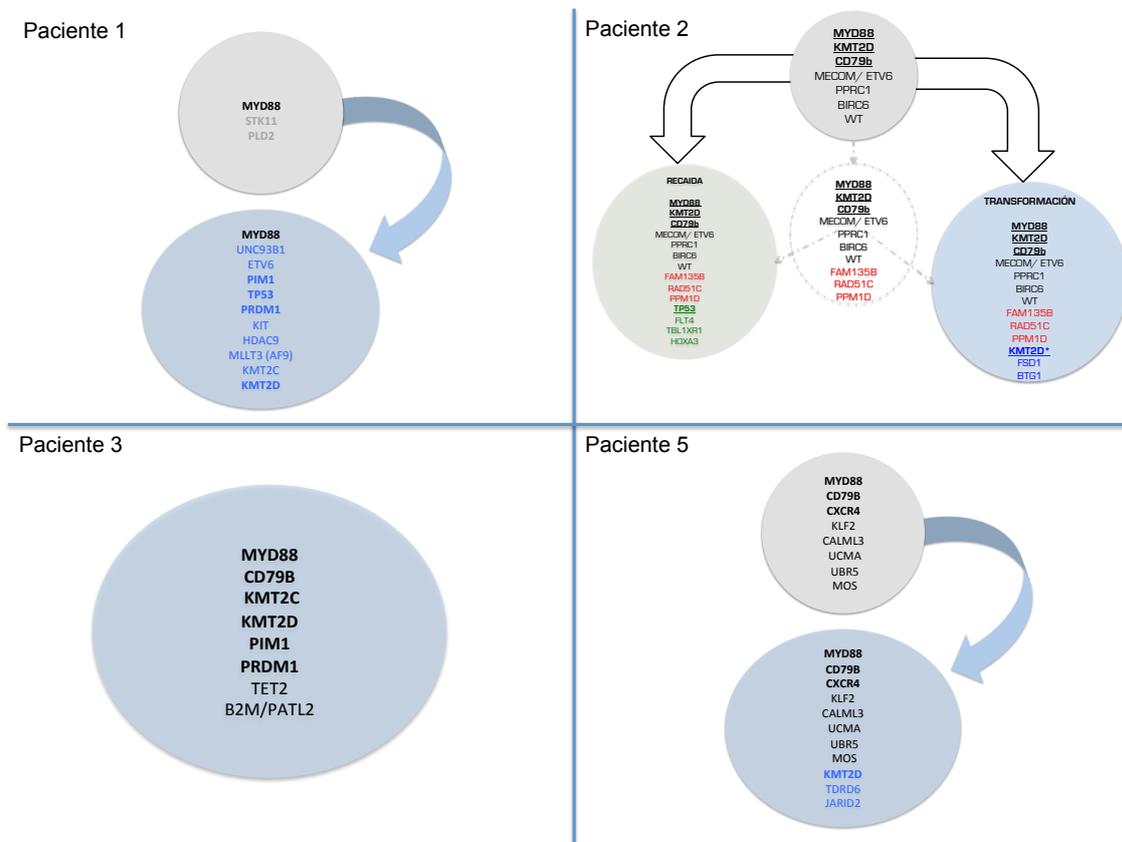


Figura 25. Resumen del patrón de mutaciones de los 4 pacientes con transformación de MW.

En los pacientes 1 y 5 observamos una adquisición de una gran número de mutaciones en la transformación. Si bien un pequeño número de mutaciones presentes en el clon del diagnóstico no se detectaron en la transformación (en gris claro), la gran mayoría de las mutaciones encontradas a nivel clonal al diagnóstico permanecieron en la transformación manteniendo la frecuencia relativa clonal respecto a las demás mutaciones. La evaluación de los subclones, dada la infiltración de la primera muestra (12%) no permite aproximar los resultados con seguridad. Sin embargo, es posible intuir una cierta ramificación de los clones que únicamente comparten la mutación más frecuente de esta enfermedad (en *MYD88* p. L265P).

El pacientes 2 tuvo una recaída sintomática antes de la transformación, y analizamos el perfil mutacional en este momento como se ha descrito. Curiosamente en ambos momentos (transformación y recaída), aparecieron

mutaciones no presentes al diagnóstico (representadas en rojo). En el momento de la recaída (año 2013) aparecieron mutaciones añadidas a las representadas en rojo (en verde) que curiosamente no se constataron en la transformación. En la transformación aparecieron otras añadidas (representadas en azul). Esto sugiere la posible existencia de clones intermedios donde aparecieran las mutaciones añadidas (de forma lineal) a la célula clonal del diagnóstico, y una evolución ramificada o “branching” o “branched”<sup>142</sup> posterior, en la que los clones se alternan como se expone en este paciente.

Este es uno de los modelos de evolución clonal que aparecen en múltiples hemopatías y tumores en general. De hecho, se ha descrito en MM<sup>143</sup>, donde parece que es un patrón evolutivo frecuente<sup>144</sup>. También se ha observado en leucemia linfoblástica aguda (LLA)<sup>145</sup>, en LLC donde se han estudiado series cortas de casos demostrando patrones heterogéneos de evolución<sup>146</sup>, llegándose a estudiar incluso los patrones de evolución de mutaciones subclonales en esta enfermedad<sup>70</sup>.

**DISCUSIÓN****MUTACIONES IMPLICADAS EN LOS DIFERENTES MOMENTOS EVOLUTIVOS**

Las mutaciones encontradas pueden agruparse en relación al momento de su aparición en la evolución de la enfermedad y en relación al mecanismo oncogénico en el que están involucradas. En relación al momento de su aparición podemos clasificar las mutaciones como aquellas que aparecen desde el principio de la enfermedad, o aquellas que se adquieren en la evolución, favoreciendo una alteración o cambio en las características fenotípicas y semiológicas de la enfermedad.

**Mutaciones que aparecen desde el momento del diagnóstico de la enfermedad involucradas en linfomagénesis**

Se observaron una media de 40 mutaciones en el momento del diagnóstico (que no aparecían en la línea germinal) implicadas en cáncer, y una media de 200 variantes no descritas previamente en cáncer, no presentes en la línea germinal. Se seleccionaron aquellas que, tomando como referencia el porcentaje de infiltración de la muestra, fueran compatibles con mutaciones presentes en todo el clon tumoral.

***MYD88***

La mutación de *MYD88* que aparece en la mayoría de pacientes<sup>147,148</sup> con MW es una mutación no sinónima en la que un cambio de base c.794T>C origina un cambio de aminoácido p.L265P que implica la activación tónica de la vía NF-Kb que origina esta mutación, favorece la supervivencia de las células tumorales. En el artículo original donde se describió esta mutación. En nuestro caso, esta mutación apareció todos los casos.

En dos de los pacientes (Paciente 1, 2 y Paciente 3), observamos un aumento de frecuencia alélica.

En el Paciente 3, del que se dispone de muestra en la transformación, se observó una frecuencia del 16% de la mutación, siendo esta la infiltración de la muestra también, mientras que las otras mutaciones acompañantes presentaron una frecuencia entre el 6 y 10% (Tabla 22). Se revisó el estudio de citogenética de la muestra en la transformación descartándose la presencia de delección del cromosoma 3 que podrían justificar la aparición de la mutación en hemicingosis. El Paciente 1 tenía en la muestra del diagnóstico una infiltración

de 12% y la mutación de *MYD88* apareció en un 6% de las lecturas, siendo compatible con una mutación en heterocigosis, al igual que el resto de las mutaciones acompañantes que tenían frecuencias similares o algo inferiores. En la muestra de la transformación, con un 40% de infiltración, mientras que las otras mutaciones acompañantes mantuvieron su frecuencia con un un 20% de lecturas mutadas, *MYD88* presentó una frecuencia alélica del 61%. Si bien en una muestra no separada no podemos estimar con precisión la cigosidad de la mutación, no deja de ser llamativo el aumento de la frecuencia de la mutación. No se dispuso de metafases valorables en las muestras tumorales para valorar pérdidas del cromosoma 3. En el Paciente 2, la frecuencia de la mutación de *MYD88* también duplicó en frecuencia al resto de las mutaciones del paciente. No se dispuso tampoco de estudio citogenético complementario. Se realizó PCR alelo específica confirmando la presencia de la mutación y su frecuencia en cada momento evolutivo<sup>148</sup>.

### **CD79B**

En 3 de los 4 casos (Paciente 2, 3 y 5), encontramos mutaciones de CD79b, y en los tres casos, se afectó la primera tirosina perteneciente al dominio de activación del receptor (immunoreceptor tyrosin-based activation motif -ITAM-), donde éste se fosforila y activa. En dos de los casos se produjo el cambio p.Y196H y en el tercer caso, el cambio Y196C. Estas mutaciones inhabilitarían uno de los sitios de activación del receptor y la propagación de las señales activadoras de BCR a la célula B. Este hecho, aparentemente desventajoso para la célula tumoral, no lo es tanto si tenemos en cuenta persiste un segundo dominio activo, que esta mutación logra la sobreexpresión de BCR y que además atenúa la inhibición ejercida por Lyn kinasa, un regulador negativo de la vía<sup>60</sup>. La frecuencia de mutaciones de *CD79B + CD79A* en MW es baja, en torno al 10%.<sup>149</sup> Estas mutaciones se han descrito con mayor frecuencia en LDCBG tipo ABC. Se definen como mutaciones driver de la adquisición del fenotipo de linfoma, aunque por sí solas el potencial oncogénico es limitado y requieren la coadyuvancia de otras mutaciones para favorecer el paso a linfoma agresivo.<sup>60,150</sup>

### **Mutaciones de los genes MLL**

Hubo alteraciones de alguno o varios de los genes de *MLL* a lo largo de la evolución hacia la transformación en todos los pacientes que se estudiaron en este momento evolutivo (n=4). Llama la atención la presencia de mutaciones de *MLL2 (KMT2D)* en forma clonal o subclonal en todos los casos en la transformación, así como la presencia de mutaciones de *MLL3 (KMT2C)* en el paciente 1 desde el diagnóstico y que de forma llamativa no se mantuvieron las mismas alteraciones en la transformación si no que aparecieron otras diferentes afectando a este gen y a *MLL3*.

Aunque la infiltración tumoral variable no permite hacer estudios de subclonalidad, este hecho hace pensar en un patrón evolutivo no lineal y en la convergencia evolutiva de las mutaciones para adquirir un determinado fenotipo patológico, hecho ya descrito en otras enfermedad como el LF<sup>53</sup>.

Los genes *MLL1, 2 y 3 (KMT2A, D y C)* codifican para las proteínas Lysin (K) metil transferasas, implicadas en la metilación de histonas (ver Introducción). Se encuentran separados en diferentes cromosomas (*MLL1*, cromosoma 11; *MLL2*, cromosoma 12 y *MLL3*, cromosoma 7). Las mutaciones fueron revisadas en bases de datos poblacionales y de enfermedades oncológicas sin encontrar un patrón de polimorfismo para ninguna de las mutaciones encontradas. El papel de *MLL1*, como gen involucrado en traslocaciones que caracterizan leucemias agudas es bien conocido<sup>151</sup>. Se trata de traslocaciones que se asocian al tratamiento previo con inhibidores de topoisomerasa y en caso de leucemias infantiles, se sabe que son mutaciones adquiridas intraútero que generan posteriormente la enfermedad leucémica. Pero más allá de las traslocaciones conocidas, el papel de los MLL en cáncer es especialmente relevante y en diversos tipos de tumores, y los estudios de secuenciación han revelado la frecuencia real de estas mutaciones. Se han identificado cientos de mutaciones en *KMT2C* y *KMT2D*, siendo ya dos de los genes más mutados en cáncer.<sup>152</sup> *KMT2D* aparece mutado en LNH (LF y LDCBG)<sup>59,153</sup>, meduloblastoma y otros tumores de estirpe neuroectodérmica.<sup>154</sup> La mayoría de las mutaciones de *KMT2C* y *KMT2D* en cáncer ocasionan un cambio en el marco de lectura y mutaciones sin sentido que originarán proteínas truncadas o funcionalmente inactivas. Las mutaciones que impactan los dominios SET y dominios PHD representan alrededor del 25% del total de mutaciones de *KMT2C* y entre el 37% y el 60% del total de mutaciones

*KMT2D*. Los dominios zinc-finger-like PHD aparecen en proteínas nucleares involucradas en la regulación transcripcional de la cromatina. Además, se ha descrito un porcentaje desproporcionadamente elevado de mutaciones en los aminoácidos de los dominios PHD de *KMT2C* y *KMT2D*, lo que sugiere que los dominios PHD de *KMT2C* y *KMT2D* tienen un papel importante como supresores tumorales.<sup>155</sup> En nuestros 4 pacientes, observamos mutaciones que originaban codon STOP, cambio en la pauta de lectura o mutaciones no sinónimas afectando a las mencionadas regiones PHD.

Se ha estudiado también una hipótesis que justifique un mecanismo epigenético por el cual *KMT2C* y *KMT2D* ejerzan sus efectos oncogénicos. Se conoce la importancia que tienen estas transferasas en la metilación de H3K4me1, actuando sobre enhancers que promueven la expresión de los programas de diferenciación celular.<sup>156,157</sup> Por ello, las mutaciones de pérdida de función promoverían la tumorigénesis por la ruptura de los programas de desarrollo normal y / o la posible alteración de redes de genes en las que está implicada la regulación por los supresores de tumores (*TP53*) y oncoproteínas (por ejemplo, *MYC*).<sup>155</sup> *MLL2* se ha propuesto como un supresor tumoral, afectado en estadios tempranos de la enfermedad y cuya alteración altere mecanismos epigenéticos que favorezcan la linfomagénesis<sup>158</sup>. Sin embargo, cómo estos procesos aparentemente sutiles acaban afectando toda la maquinaria funcional de la célula B están por descubrir.

Por último, en relación a la MW, el artículo de S. Treon<sup>147</sup> que definió por primera vez la mutación de *MYD88* L265P, indicó que en los casos estudiados, aparecían mutaciones de *MLL2* en pacientes que no tenían la mutación de *MYD88*, pero nunca se observaban asociadas. Nosotros observamos la misma situación en el momento del diagnóstico en los pacientes 1, 3 y 5: no aparecen ambas mutaciones (*MYD88* + *KMT2D*) al diagnóstico. Sin embargo, en el momento de la transformación, se observan asociadas, lo que tal vez tenga relación con el carácter agresivo de este estadio, con fenotipo de LDCBG donde sí se observan<sup>153</sup> y que no es característico de la indolente MW. El paciente 2 resulta ser la excepción, ya que presenta desde el diagnóstico ambas mutaciones. En la transformación, mantiene ambas mutaciones, pero curiosamente asocia una nueva mutación de *MLL2*, que origina un cambio en la pauta de lectura y que por su frecuencia parece limitarse al clon de células

grandes (ya que la muestra no estaba separada y presentaba ambas poblaciones celulares: MW y LDCBG).

<p><b>KMT2C</b> c.8390delA Proteína: p.K2797Rfs*26 frameshift) Frecuencia: 3%</p>	<p><b>KMT2C</b> c.2263C&gt;T (stop) Frecuencia: 6% <b>KMT2C</b> c.2189C&gt;A Frecuencia: 3% TX <b>KMT2C</b> c.14707G&gt;T Frecuencia: 3% TX</p> <p><b>KMT2D</b> c.706G&gt;T Proteína: p.G236W (NS) → PHD domain Frecuencia: 3%</p>
<p><b>KMT2D</b> c.15120delC (frameshift) Frecuencia: 11%</p>	<p><b>KMT2D</b> c.15120delC (frameshift) Frecuencia: 22%</p> <p><b>KMT2D</b> c.9459delG (frameshift) Frecuencia: 5%</p>
	<p><b>KMT2C</b>c.5053G&gt;T Frecuencia: 7% (65) <b>KMT2C</b> c.1139G&gt;T Frecuencia: 6.6% (1297) <b>KMT2C</b> c.1173C&gt;A (stop) Frecuencia: 6% (832)</p> <p><b>KMT2D</b>c.9835C&gt;T (stop) Frecuencia: 7.5% (278)</p>
<p><b>KMT2A</b> c.11532C&gt;A Frecuencia alélica: 3%</p>	<p><b>KMT2D</b> c.3695C&gt;T →PHD domain Frecuencia alélica: 5 %</p>

Tabla 25. Resumen mutaciones MLL2 y MLL3 en los casos estudiados

### **MLLT3**

Aparece en un único caso (paciente 1). Se trata de una mutación que afecta al marco de lectura. Este gen es conocido por su translocación con el gen MLL1, localizado en el cromosoma 11 dando lugar a la translocación (9;11) característica de LMA, siendo la mutación de mejor pronóstico de cuantas afectan a MLL1 en esta enfermedad.<sup>157</sup>

Se ha descrito recientemente la interacción entre el co-represor de BCL6 con el dominio carboxiterminal de MLLT3 ó AF9.<sup>158</sup> A pesar de su implicación en las traslocaciones mencionadas, su papel en linfomas se desconoce.

### **CXCR4**

CXCR-4 es un receptor específico de SDF-1 (factor derivado de estroma tipo 1), también llamado CXCL12, una molécula con gran actividad

quimiotáctica sobre los linfocitos. CXCR4 es uno de los varios receptores de quimioquinas que el VIH puede utilizar para infectar a los linfocitos CD4 +, aunque no está claro si la presencia de CXCR4 como anclaje para el VIH es una consecuencia o una causa de la inmunodeficiencia. SDF-1, el ligando de CXCR4, está implicado en el “homing” o reclutamiento de las células madre en el estroma de la médula ósea y también influye en el estado de quiescencia de células madre hematopoyéticas. Se sabe que la molécula de ubiquitina es un ligando natural de CXCR4<sup>159</sup> La unión de ubiquitina a las proteínas constituye un mecanismo de marcaje de las mismas para su posterior destrucción por el proteasoma, y es el sistema de eliminación de las proteínas mal plegadas. Pero además, parece que la ubiquitina es un modulador de la respuesta inflamatoria, y permite evitar los daños derivados de una respuesta inflamatoria excesiva.<sup>160</sup> Se ha planteado también que estos mecanismos antiinflamatorios se desarrollan a través de su interacción con CXCR4<sup>161</sup>.

Por su acción en la médula ósea, el bloqueo de CXCR4 logra la movilización de los precursores hematopoyéticos a la sangre periférica. Plerixafor (AMD3100)<sup>162</sup> actúa bloqueando este receptor para lograr la movilización inducida de los progenitores en los procesos en los que se requiere, como es el caso de la donación de progenitores para un trasplante de MO.

Las mutaciones germinales de este gen (no sinónimas o de alteración en el marco de lectura) se asocian al síndrome WHIM (Warts, Hypogammaglobulinemia, Immunodeficiency, and Myelokathexis).<sup>163</sup> Mutaciones similares a las descritas en esta enfermedad se han encontrado en pacientes con MW.<sup>164</sup> Aunque las mutaciones tipo WHIM de CXCR4 se han asociado a características clínicas de agresividad (componente monoclonal, porcentaje de infiltración al diagnóstico), no se han encontrado diferencias claras en supervivencia global determinadas por la presencia de estas mutaciones.<sup>165</sup>

Cabe destacar que en nuestros 4 pacientes secuenciados al diagnóstico y en la transformación, sólo 1 tenía la mutación de CXCR4 al diagnóstico. Se trataba de una mutación en el residuo c.1006G>T que origina un codon stop, y que como ha sido descrito en trabajos previos, afecta al dominio WHIM de la proteína. Pero en este caso, llama la atención que

apareció asociada a mutaciones clonales de *CD79B* ( y también de *MYD88*). Un trabajo reciente sólo en contró un paciente con ambas mutaciones, estando una de ellas presente de forma subclonal.

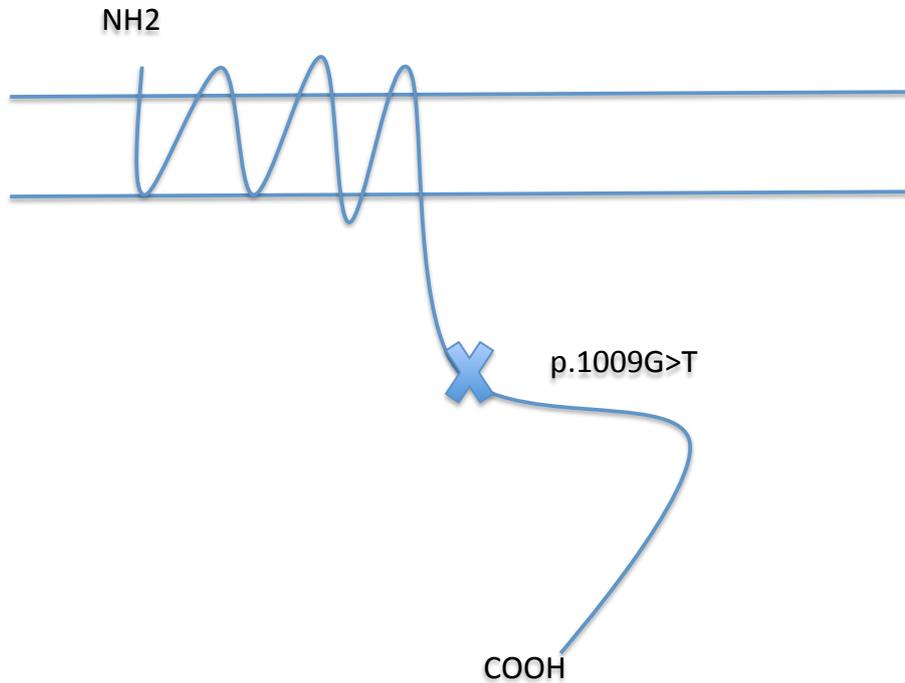


Figura 26. Mutación de CXCR4 en nuestra serie de pacientes (Paciente 5). Primera mutación descrita en este residuo.

### **Mutaciones recurrentes en la transformacion**

Se observaron una media de 55 mutaciones en el momento de la transformación (que no aparecían en la línea germinal) implicadas en cáncer, y una media de 250 variantes no descritas previamente en cáncer, no presentes en la línea germinal. Se seleccionaron aquellas que, tomando como referencia el porcentaje de infiltración de la muestra, fueran compatibles con mutaciones presentes en todo el clon tumoral y se observaron también aquellas que desempeñan un papel en la génesis de linfomas agresivos.

***MLL2*** (ver apartado previo: *Mutaciones de los genes MLL*)

### ***TP53***

Aparece como mutación somática en los paciente 1 y 2. En el primero en el momento de la transformación y en el segundo en la recaída. Los mecanismos de funcioamiento de TP53 se han explicado en la introducción. En la especie humana, el gen p53 o TP53, también llamado el "guardián del

genoma", se encuentra en el brazo corto del cromosoma 17 (17p13) y codifica un factor de transcripción nuclear de 43.7 KDa. Su nombre hace referencia a su masa molecular aparente (corre como una proteína de 53 Kda en la electroforesis) debida a la gran cantidad de residuos de prolina que contiene. Se encarga de iniciar la respuesta de la célula ante el daño del ADN, deteniendo el ciclo celular en caso de mutación. Su actividad en múltiples tumores más que conocida. Respecto a la MW, se ha descrito un aumento de la frecuencia de su inactivación / deleción a lo largo del desarrollo de la enfermedad<sup>166</sup> y se asocia a mal pronóstico en términos de supervivencia.

### ***PRDM1 (BLIMP1)***

El aumento de la expresión de Blimp-1 en los linfocitos B , así como de los linfocitos T, las células NK y otras células del sistema inmune, desencadena una respuesta inmune al estimular la proliferación y diferenciación de las células plasmáticas secretoras de anticuerpos<sup>167 168</sup> . Blimp-1 regula las células madre hematopoyéticas y es un represor transcripcional conocido.<sup>169</sup>

Las mutaciones de BLIMP1 favorecen la linfomagénesis en el caso de los LDCBG, más frecuente en el subtipo ABC.<sup>59,170,171</sup>

En nuestra serie de pacientes, encontramos mutaciones en la transformación en dos de ellos (pacientes 1 y 3). En los dos casos, se trató de mutaciones puntuales no sinónimas. La relación de esta mutación con el desarrollo de LDCBG merece considerar su importancia en casos de transformación de linfoma indolente a linfoma agresivo.

### ***PIM1***

El gen *PIM1* humano codifica serin-treonin quinasa, que pertenece al grupo de las reguladas por calcio / calmodulina (CAMK). Contiene un dominio quinasa característico, con una zona de anclaje de ATP y un sitio activo. La expresión de Pim-1 está muy extendida (desde el sistema hematopoyético y linfoide a la próstata, testículo y células epiteliales orales). Pim-1 es capaz de fosforilar diferentes proteínas o dianas, la mayoría implicadas en la progresión del ciclo celular o que intervienen en los mecanismos de apoptosis. La expresión de Pim-1 puede ser inducida por varios estímulos externos entre ellas señalizadores químicos (quimiocinas) del sistema inmune.

En el caso de los linfomas agresivos, se ha demostrado que es uno de los genes con zonas frecuentemente mutadas o “hot spots”. Además, la hipermutación somática aberrante afecta ( como entre otros muchos genes) a sus proto-oncogenes *PIM1*. De hecho, en *PIM1*, *MYC*, *RhoH / TTF (ARHH)* y *PAX5*, esto sucede en más del 50% de los linfomas de células grandes difusas.<sup>172</sup> De hecho, se han realizado análisis para identificar el motivo de que estos genes sean dianas de la AID. Las zonas ricas en las secuencias RGYW/WRCY favorecen la actividad desamina las citidina (que se convierte en uracilo)<sup>173</sup>. Pues bien, *PIM1* expresa estas repeticiones RGYW y su antisentido WRCY en su secuencia (22343534), lo que favorece la actividad sobre este gen de la AID.

Parece que *PIM1* y *TP53* interactúan en la detección de estrés ribosomal y parece que el nivel de *PIM1* y su funcionalidad puede ser relevante para que las células cancerosas reaccionen al estrés ribosomal que inducen algunos quimioterápicos. Por lo que su mutación podrían favorecer resistencia a estas estrategias anticancerosas.<sup>174</sup> *CMYC* no resultó mutado, y sí amplificado en uno de los pacientes de los 3 en los que se estudió (Paciente 2).

**Resumen de las mutaciones recurrentes al diagnóstico y en la transformación en los 4 casos**

	5 D	2 D	3 T	1 D
<i>MYD88</i>				
<i>CD79b</i>				
<i>CXCR4</i>				
<i>KMT2A</i>				
<i>KMT2C</i>				
<i>KMT2D</i>				
<i>TP53</i>				
<i>PIM1</i>				
<i>MLLT3</i>				
<i>PRDM1</i>				

	5 T	2 T	2 R	3 T	1 T
<i>MYD88</i>					
<i>CD79b</i>					
<i>CXCR4</i>					
<i>KMT2A</i>					
<i>KMT2C</i>					
<i>KMT2D</i>					
<i>TP53</i>					
<i>PIM1</i>					
<i>MLLT3</i>					
<i>PRDM1</i>					

Figura 27. Se representa en rojo las mutaciones adquiridas al diagnóstico, el azul las adquiridas o presentes en las transformación (en las que no se ha podido evidenciar si estaban al diagnóstico) En el paciente 2R se ha representado una celda con los dos colores ya que posía una mutación en MLL2 desde el diagnóstico, pero se asoció una nueva mutación probablemente limitada al clon de LDCBG.

## DISCUSIÓN GENERAL

Los trabajos presentados en esta tesis doctoral han intentado contextualizar la transformación de los linfomas indolentes, prestando especial atención al LF, debido a que es el segundo linfoma más frecuente en Europa y América, sólo por detrás del LDCBG.<sup>177</sup> El primer trabajo se trata de una investigación clínica analizando la incidencia acumulada de transformación histológica en el grupo de pacientes con linfoma folicular en España, y su valor reside en el gran tamaño muestral fruto de una colaboración de 18 hospitales y el valor añadido del tratarse de una recogida de datos de práctica clínica diaria, siendo un fiel reflejo de la situación clínica real, no restringida a ensayos clínicos, y por lo tanto donde todos los pacientes que tratamos, habrán sido reflejados.

Hemos encontrado que la transformación histológica, es decir, el cambio que experimentan las células tumorales del linfoma folicular adquiriendo características genotípicas y fenotípicas de linfoma agresivo (normalmente LDCBG), tiene una asociación clara con las características clínicas de la enfermedad al diagnóstico. Este hecho nos invita a intuir que la agresividad clínica y biológica están asociadas en esta enfermedad. De hecho, se han identificado firmas genéticas, como el llamado m7-FLIPI, que incrementen la sensibilidad y precisión de los índices pronósticos habituales al definir los casos de linfoma folicular agresivo<sup>178</sup>, y se acabarán señalando marcadores moleculares que pronostiquen con mayor sensibilidad la transformación. Y esto es necesario, ya que como hemos demostrado, la TH en sí es uno de los factores que más influyen en la supervivencia global de los pacientes con linfoma folicular. Hemos observado también un hecho aparentemente obvio pero muy interesante. Una de las variables que con más fuerza impacta la incidencia de transformación y la supervivencia de los pacientes que se transforman es la calidad de la respuesta a la primera línea de tratamiento, bien para el LF o para el LFt, respectivamente. Aquellos pacientes que no alcanzan una respuesta completa en estas situaciones, tienen un pronóstico peor que los que responden de forma completa. Y de forma muy significativa, aquellos pacientes con linfoma

folicular que no alcanzan una RC, tienen muchas más probabilidades de transformarse en un linfoma agresivo. Si bien es una asociación que podríamos predecir con facilidad, en su simplicidad se esconde el equilibrio inestable de las neoplasias, los mecanismos de resistencia, de escape clonal y presión evolutiva que probablemente sean clave para iniciar estrategias que no sólo ayuden a predecir sino también a evitar la transformación agresiva, en este caso, del linfoma folicular.

Destaca la diferencia de supervivencia que existe entre los pacientes diagnosticados de linfoma LFt de novo y el LFt que aparece tras una evolución previa como LF, bajo tratamiento en la mayoría de los casos. El factor temporal y probablemente la presión evolutiva que ejercen los tratamientos empleados, sean responsables de que ambas entidades tengan diferentes tasas de supervivencia, favorables para el grupo de LFt de novo, pues son más sensibles a los tratamientos empleados. Sin embargo, a pesar de esta observación clínica, hasta el momento no disponemos de un perfil biológico diferencial entre ambas entidades (LFt de novo y LFt tras una etapa previa de LF), algo que sin duda tiene un gran interés para desentrañar el papel de los factores mencionados (tiempo, tratamiento) en la adquisición de un genotipo concreto.

El segundo trabajo parte de la observación de un número no desdeñable de pacientes con sospecha y confirmación de transformación agresiva del LF en el momento del diagnóstico. Durante el reclutamiento de pacientes para el estudio previo, observamos la existencia de este grupo de enfermos y nos planteamos con qué frecuencia aparecen estos posibles casos en nuestro medio, seguramente infradiagnosticados muchas de las veces. Para ello seleccionamos el grupo de pacientes donde probablemente se agruparan. Este grupo, es el de los pacientes con LDCBG, principalmente. En los casos en los que en un mismo paciente se observan en la misma localización anatómica, o en localizaciones separadas, diferentes histologías de linfoma, el clínico tomará ambas en consideración, pero tratará con mayor urgencia aquella de mayor agresividad. No existe una definición específica ni un sistema de estadificación propio en estas situaciones, lo que permite que los médicos hagamos constar la coexistencia de dos enfermedades tumorales de forma

## DISCUSIÓN

arbitraria. Por este motivo, seleccionamos un grupo de pacientes con linfoma agresivo y nos centramos en buscar la presencia de una histología indolente en la MO (donde se agruparían muchos pacientes con linfoma indolente transformado). Recogimos también la infiltración por linfoma agresivo y ausencia de infiltración y comparamos sus características clínicas, biológicas y tasas de supervivencia. El número de pacientes que cumplen los requisitos que mencionamos para ser un posible LFT, se sitúa en algo menos de la mitad de pacientes con LDCBG e infiltración de MO, lo que supone un 10% aproximadamente del total de pacientes con LDCBG. La mayoría de los analizados están clonalmente relacionados, con una frecuencia algo superior a la observada previamente, aunque con un limitado tamaño de muestra en ambos casos<sup>39</sup> y su pronóstico es mejor que aquellos donde la enfermedad presenta un fenotipo agresivo en todas sus localizaciones. Estos probables LFT no han estado expuestos a quimioterapia previa y por tanto su perfil de comportamiento se asemejaría a un linfoma agresivo de nuevo diagnóstico, pero en los cuáles no debemos olvidar que existe una población de células con una velocidad de crecimiento lenta, y probablemente con diferentes programas celulares activos y distintas sensibilidades a los tratamientos. Esto se traduce en una tendencia a una mayor tasa de recaída en comparación con los pacientes sin infiltración de MO por linfomas de bajo grado que en nuestro trabajo no ha resultado estadísticamente significativo pero si en estudios previos.<sup>38,131</sup>

El tercer trabajo, consiste en una aproximación biológica a la transformación de linfomas indolentes. Seleccionamos la MW por tratarse de una entidad en la que la transformación es extremadamente rara pero asocia un pronóstico desfavorable. Durante la realización del primer trabajo, surgieron en nuestro medio dos casos de MW que experimentaron una transformación a linfoma agresivo. Este hecho, no ha sido estudiado genéticamente hasta la actualidad, y únicamente disponíamos de casos clínicos que describían su existencia.<sup>87</sup> El estudio de exoma completo comparando la muestra al diagnóstico con la de la recaída (utilizando para validar las mutaciones el ADN germinal del paciente), ha permitido observar los patrones de mutación en los distintos momentos evolutivos de la MW y los modelos de evolución. De hecho, tras la observación de los paciente 1,

3 y 5, en los que se sólo disponemos de una muestra inicial y una final (sin muestras intermedias), observamos un patrón bastante lineal de evolución donde la mayor parte de las mutaciones que aparecen en el clon tumoral al diagnóstico se mantienen como mutaciones clonales hasta el final. Algunas desaparecen, pero las que tienen conocida actividad oncogénica se mantienen. En cambio, el paciente 2, del que disponemos de una muestra de recaída intermedia, nos permite observar que el último clon en manifestarse lo hace sin tener mutaciones en genes que aparecieron mutados en una recaída previa y de conocido papel oncogénico, como *TP53*.

Hemos observado la confluencia desde el diagnóstico de mutaciones en genes que se encuentran frecuentemente afectados en LDCBG (en concreto en el subtipo ABC) tales como *CD79B* y que junto con *MYD88* L265P (presente en todos los casos en todas la células tumorales) que favorecen la actividad de la vía del receptor de la célula B, característicamente activa en los LDCBG tipo ABC. *MYD88* está mutado también en otras neoplasias hematológicas, como LLC, donde se concentra de pacientes jóvenes<sup>179</sup> y ayuda a confirmar el diagnóstico de MW.

En el momento de la transformación encontramos mutaciones en genes con conocida capacidad de desarrollo oncogénico en el LDCBG como son *PIM1*, *PRDM1(BLIMP1)*<sup>172</sup>, también ligados a un perfil de expresión de tipo ABC, o *TP53*. Sin embargo, el hecho que sorprende es la presencia de mutaciones inactivadoras del gen *MLL2 (KMT2D)* en todos los pacientes. Su inactivación constituye un estadio precoz en la génesis del LDCBG<sup>53,59,149,155,160</sup> y favorece la adquisición de eventos genéticos que contribuyen al desarrollo del linfoma agresivo. También se observan mutaciones en este gen con gran frecuencia en LF y con menos frecuencia en LLC y en MW, aunque curiosamente, al diagnóstico, se trata de una mutación que en los casos descritos parece ser mutuamente excluyente con la mutación de *MYD88*. Este trabajo nos explica biológicamente lo que observamos o intuimos desde la clínica y responde a las preguntas de cómo se suceden las alteraciones genéticas en MW. A raíz de este trabajo, surge la necesidad de plantear modelos experimentales que nos permitan observar la capacidad transformante de las mutaciones encontradas en

esta enfermedad. Este trabajo nos permite comparar el perfil mutacional de la MW con el descrito en LF y en LLC, principalmente. Al igual que sucede en la transformación de LF, las células adquieren en la transformación mutaciones en genes que afectan a la regulación del ciclo celular y a la respuesta al daño del ADN (como *TP53* y *PIM1*, comunes a ambos procesos de transformación). Sin embargo, *MLL2* aparece en ambos momentos de la transformación en el caso del LF, enfermedad en la que es según estudios recientes es el gen más frecuentemente mutado.<sup>59</sup> En MW, podemos asumir que no se trata de una lesión inicial ya que en  $\frac{3}{4}$  de los pacientes no se observó ninguna lectura con la mutación en el momento del diagnóstico. Por el contrario, las mutaciones de *CD79B*, de situación indefinida en el LFt, en MW están desde el momento del diagnóstico, por lo que serían mutaciones compartidas.<sup>54</sup> La desregulación de *CMYC* y la pérdida bialélica de *CDKN2A* son eventos más frecuentes en LFt que en LF. Nosotros pudimos realizar estudios de hibridación in situ con sondas para *MYC*, y en uno de los 3 pacientes en los que se observó transformación (Paciente 2) aparecieron ganancias del gen. Hemos observado también mutaciones de *PRDM1*, características de LDCBG tipo ABC y/o non-GCB<sup>180</sup>. Si bien el LFt presenta un perfil mutacional y transcripcional más acercado al LDCBG tipo GCB aunque con características propias de los ABC, como la hiperactividad de la vía de BCR o NF-KB<sup>53,54</sup>. Cuando la célula de LLC se transforma hacia célula de LDCBG, el evento genético más característico es la mutación o delección de *TP53* (en al menos 60% de los casos)<sup>73</sup>. Los otros mecanismos consisten en mutaciones activadoras de *NOTCH1*<sup>74</sup> y la sobreexpresión (activación) de *MYC* junto con delecciones de *CDKN2A*<sup>181</sup> entre otras. De forma análoga a lo que sucede en LF, comparten mecanismos con LDCBG, pero su perfil de expresión no se enmarca con un tipo de LDCBG concreto (ABC o GCB) y posee alteraciones que definen y respetan su origen de LLC. En MW, observamos una situación similar, ya que la célula adquiere mutaciones típicas de LDCBG ABC, pero comparte y combina las mismas con la mutación de genes de regulación de histonas, más característicos de las neoplasias con programas genéticos de tipo GCB, y presenta alteraciones

## DISCUSIÓN

propias que le distinguen de las otras transformaciones y del grupo de LDCBG primario.

Los tres trabajos nos permiten concluir que, el linfoma transformado no es una enfermedad concreta ni única. La transformación es la manifestación del carácter evolutivo y dinámico de las enfermedades neoplásicas, y entender este dinamismo en su comportamiento es clave. Existen diferentes formas de orquestar una evolución hacia una enfermedad agresiva: diferentes rutas metabólicas, cascadas de señalización, mecanismos de evasión inmune, reprogramación celular, etcétera. Todas ellas interactúan para conseguir transformar el *carácter* indolente de un linfoma en agresivo. Habrá, por lo tanto, multitud de rutas y patrones de evolución, y existirá la posibilidad de que la enfermedad se manifieste en cualquiera de los puntos de esa evolución.

Sería de gran relevancia poder identificar características clínicas y biológicas que nos permitieran, en el momento del diagnóstico, seleccionar aquellos pacientes con mayor riesgo de transformación. Lamentablemente, este conocimiento, aunque muy valioso, por sí mismo sólo podría llevarnos a una actitud más observadora, pero únicamente podríamos observar con más atención el hecho que habríamos podido predecir. Sin embargo, si profundizamos en el conocimiento de los mecanismos de presión evolutiva que dirigen la transformación progresiva de los clones tumorales, y buscamos aquello que altera el equilibrio de los mismos (para que se favorezca la expansión unos u otros)<sup>102,182</sup>, podríamos adoptar las estrategias terapéuticas para evitar la selección de aquellos resistentes y/o agresivos.<sup>183</sup> En los próximos años, la edición de los genomas de las enfermedades, utilizando todo el arsenal de herramientas disponibles y en investigación, tendría cada vez más sentido y mejores resultados. No lo alcanzaremos bajo un único punto de vista. Necesitaremos la colaboración de todas disciplinas posibles en la práctica clínica diaria para abordar la integridad del proceso. Se plantea numerosas veces que las dianas terapéuticas no consiguen alterar el pronóstico de las enfermedades. Con todos los trabajos que leemos en biología del cáncer en estos días, nos damos cuenta de que hay un ejército genómico en cada enfermedad. Es

## DISCUSIÓN

evidente que la lucha contra una parte del mismo no nos puede conducir al éxito final contra todo el ejército. Debemos alejarnos y llegar a comprender el proceso en su conjunto, observar los modelos de enfermedad, y entender contra quién nos enfrentamos en cada caso; esto probablemente esconde las claves hacia donde debemos dirigir nuestros esfuerzos terapéuticos con mayor eficacia y ejerciendo menos daños innecesarios.

---

“More research should be directed towards understanding and controlling the evolutionary process in tumours before it reaches the late stage seen in clinical cancer”.

(P. Nowell, 1976).

---

## CONCLUSIONES

1. Es preciso consensuar internacionalmente la definición de transformación de LF para conocer la incidencia global de transformación histológica, y debido a la relativamente baja incidencia de esta entidad, necesitamos estudios multicéntricos retrospectivos y prospectivos de carácter internacional para definir el pronóstico en base a las estrategias disponibles de tratamiento, incluyendo el trasplante autólogo y alogénico.

2. Dado que el mayor riesgo de transformación se ha asociado con aquellos pacientes que no responden adecuadamente a los tratamientos, con índices pronósticos más altos, y por tanto con más posibilidades de ser pacientes refractarios, deben incorporarse nuevos fármacos, dentro de ensayos clínicos, en las opciones terapéuticas en el tratamiento del linfoma folicular, buscando alcanzar las mejores respuestas posibles.

3. Los LDCBG con infiltración discordante de la médula ósea representan un grupo de linfomas de fenotipo heterogéneo y en los cuales, con frecuencia, ambas histologías están clonalmente relacionadas.

4. El impacto sobre el pronóstico de los enfermos se ha asociado a un pronóstico menos desfavorable que el observado

en los pacientes con LDCBG con afectación concordante de la MO, en los que hemos observado una asociación con un comportamiento agresivo, con elevada tasa de recaídas en SNC.

5. En los casos de transformación de macroglobulinemia de Waldeström, encontramos mutaciones características de esta enfermedad asociadas de forma recurrente con mutaciones en genes típicamente implicados en LDCBG, que deberían ser consideradas en series prospectivas como potenciales marcadores desde el diagnóstico del evento de transformación.

6. La aparición de mutaciones de *MLL2*, descritas en LDCBG, se observan en el momento de la transformación, junto con mutaciones en otros genes cuya implicación ya se ha descrito en la transformación de otros linfomas indolentes y en LDCBG de novo como son *TP53*, *BLIMP1* o *PIM1*, lo que permite plantear la existencia de mecanismos compartidos por diferentes linfomas indolentes para realizar el cambio de un linfoma con fenotipo indolente por un fenotipo agresivo, y plantear tratamientos que tengan en consideración estos mecanismos biológicos.

---

DIFUSIÓN DE LOS RESULTADOS

## **DIFUSIÓN DE LOS RESULTADOS**



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Yoshimoto M. The first wave of B lymphopoiesis develops independently of stem cells in the murine embryo. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2015;1362:16-22.
2. Golub R, Cumano A. Embryonic hematopoiesis. *Blood cells, molecules & diseases* 2013;51:226-31.
3. Medvinsky A, Rybtsov S, Taoudi S. Embryonic origin of the adult hematopoietic system: advances and questions. *Development* 2011;138:1017-31.
4. Herzenberg LA, Herzenberg LA. Toward a layered immune system. *Cell* 1989;59:953-4.
5. Labrie JE, 3rd, Sah AP, Allman DM, Cancro MP, Gerstein RM. Bone marrow microenvironmental changes underlie reduced RAG-mediated recombination and B cell generation in aged mice. *The Journal of experimental medicine* 2004;200:411-23.
6. Bowman EP, Campbell JJ, Soler D, et al. Developmental switches in chemokine response profiles during B cell differentiation and maturation. *The Journal of experimental medicine* 2000;191:1303-18.
7. Cobaleda C, Schebesta A, Delogu A, Busslinger M. Pax5: the guardian of B cell identity and function. *Nature immunology* 2007;8:463-70.
8. MacLennan IC. Germinal centers. *Annual review of immunology* 1994;12:117-39.
9. Dal Porto JM, Haberman AM, Kelsoe G, Shlomchik MJ. Very low affinity B cells form germinal centers, become memory B cells, and participate in secondary immune responses when higher affinity competition is reduced. *The Journal of experimental medicine* 2002;195:1215-21.
10. Jacob J, Kelsoe G, Rajewsky K, Weiss U. Intraclonal generation of antibody mutants in germinal centres. *Nature* 1991;354:389-92.
11. Muramatsu M, Sankaranand VS, Anant S, et al. Specific expression of activation-induced cytidine deaminase (AID), a novel member of the RNA-editing deaminase family in germinal center B cells. *The Journal of biological chemistry* 1999;274:18470-6.
12. Edelman GM. Antibody structure and molecular immunology. *Science* 1973;180:830-40.
13. Matsuda F, Ishii K, Bourvagnet P, et al. The complete nucleotide sequence of the human immunoglobulin heavy chain variable region locus. *The Journal of experimental medicine* 1998;188:2151-62.
14. Pallares N, Fripiat JP, Giudicelli V, Lefranc MP. The human immunoglobulin lambda variable (IGLV) genes and joining (IGLJ) segments. *Experimental and clinical immunogenetics* 1998;15:8-18.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

15. Barbie V, Lefranc MP. The human immunoglobulin kappa variable (IGKV) genes and joining (IGKJ) segments. *Experimental and clinical immunogenetics* 1998;15:171-83.
16. Cook GP, Tomlinson IM. The human immunoglobulin VH repertoire. *Immunology today* 1995;16:237-42.
17. Reth M. Antigen receptors on B lymphocytes. *Annual review of immunology* 1992;10:97-121.
18. Vettermann C, Schlissel MS. Allelic exclusion of immunoglobulin genes: models and mechanisms. *Immunological reviews* 2010;237:22-42.
19. Hummel M, Tamaru J, Kalvelage B, Stein H. Mantle cell [previously centrocytic] lymphomas express VH genes with no or very little somatic mutations like the physiologic cells of the follicle mantle. *Blood* 1994;84:403-7.
20. Liu YJ, Zhang J, Lane PJ, Chan EY, MacLennan IC. Sites of specific B cell activation in primary and secondary responses to T cell-dependent and T cell-independent antigens. *European journal of immunology* 1991;21:2951-62.
21. Reed JC. Bcl-2-family proteins and hematologic malignancies: history and future prospects. *Blood* 2008;111:3322-30.
22. Pittaluga S, Ayoubi TA, Wlodarska I, et al. BCL-6 expression in reactive lymphoid tissue and in B-cell non-Hodgkin's lymphomas. *The Journal of pathology* 1996;179:145-50.
23. MacLennan IC, Liu YJ, Oldfield S, Zhang J, Lane PJ. The evolution of B-cell clones. *Current topics in microbiology and immunology* 1990;159:37-63.
24. Peng HZ, Du MQ, Koulis A, et al. Nonimmunoglobulin gene hypermutation in germinal center B cells. *Blood* 1999;93:2167-72.
25. Saito M, Gao J, Basso K, et al. A signaling pathway mediating downregulation of BCL6 in germinal center B cells is blocked by BCL6 gene alterations in B cell lymphoma. *Cancer cell* 2007;12:280-92.
26. Spencer J, Finn T, Pulford KA, Mason DY, Isaacson PG. The human gut contains a novel population of B lymphocytes which resemble marginal zone cells. *Clinical and experimental immunology* 1985;62:607-12.
27. Harris NL, Jaffe ES, Stein H, et al. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood* 1994;84:1361-92.
28. Montoto S, Fitzgibbon J. Transformation of indolent B-cell lymphomas. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2011;29:1827-34.
29. 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. *The American journal of surgical pathology* 2001;25:1268-76.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

30. Al-Mansour M, Connors JM, Gascoyne RD, Skinnider B, Savage KJ. Transformation to aggressive lymphoma in nodular lymphocyte-predominant Hodgkin's lymphoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2010;28:793-9.
31. Fend F, Quintanilla-Martinez L, Kumar S, et al. Composite low grade B-cell lymphomas with two immunophenotypically distinct cell populations are true biclonal lymphomas. A molecular analysis using laser capture microdissection. *The American journal of pathology* 1999;154:1857-66.
32. Koshy J, Dadfornia T, Qian YW. Diffuse large B-cell lymphoma arising in a composite lymphoma with biclonality by flow cytometry and one monoclonal band by PCR. *International journal of clinical and experimental pathology* 2014;7:407-10.
33. Lossos IS, Gascoyne RD. Transformation of follicular lymphoma. *Best practice & research Clinical haematology* 2011;24:147-63.
34. Bastion Y, Sebban C, Berger F, et al. Incidence, predictive factors, and outcome of lymphoma transformation in follicular lymphoma patients. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 1997;15:1587-94.
35. Ogata Y, Setoguchi M, Tahara T, Takahashi M. Downgraded non-Hodgkin's lymphoma in the neck occurring as a secondary malignancy. *ORL; journal for oto-rhino-laryngology and its related specialties* 1998;60:295-300.
36. Robertson LE, Redman JR, Butler JJ, et al. Discordant bone marrow involvement in diffuse large-cell lymphoma: a distinct clinical-pathologic entity associated with a continuous risk of relapse. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 1991;9:236-42.
37. Hodges GF, Lenhardt TM, Cotelingam JD. Bone marrow involvement in large-cell lymphoma. Prognostic implications of discordant disease. *American journal of clinical pathology* 1994;101:305-11.
38. Sehn LH, Scott DW, Chhanabhai M, et al. Impact of concordant and discordant bone marrow involvement on outcome in diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2011;29:1452-7.
39. Kremer M, Spitzer M, Mandl-Weber S, et al. Discordant bone marrow involvement in diffuse large B-cell lymphoma: comparative molecular analysis reveals a heterogeneous group of disorders. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 2003;83:107-14.
40. Casulo C, Burack WR, Friedberg JW. Transformed follicular non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 2015;125:40-7.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

41. Marcus R, Imrie K, Belch A, et al. CVP chemotherapy plus rituximab compared with CVP as first-line treatment for advanced follicular lymphoma. *Blood* 2005;105:1417-23.
42. Montoto S, Davies AJ, Matthews J, et al. Risk and clinical implications of transformation of follicular lymphoma to diffuse large B-cell lymphoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2007;25:2426-33.
43. Brecher M, Banks PM. Hodgkin's disease variant of Richter's syndrome. Report of eight cases. *American journal of clinical pathology* 1990;93:333-9.
44. Mulligan SP, Matutes E, Dearden C, Catovsky D. Splenic lymphoma with villous lymphocytes: natural history and response to therapy in 50 cases. *British journal of haematology* 1991;78:206-9.
45. Lin P, Mansoor A, Bueso-Ramos C, Hao S, Lai R, Medeiros LJ. Diffuse large B-cell lymphoma occurring in patients with lymphoplasmacytic lymphoma/Waldenstrom macroglobulinemia. Clinicopathologic features of 12 cases. *American journal of clinical pathology* 2003;120:246-53.
46. Al-Tourah AJ, Gill KK, Chhanabhai M, et al. Population-based analysis of incidence and outcome of transformed non-Hodgkin's lymphoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2008;26:5165-9.
47. 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. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2013;31:3272-8.
48. Pardal E, Coronado M, Martin A, et al. Intensification treatment based on early FDG-PET in patients with high-risk diffuse large B-cell lymphoma: a phase II GELTAMO trial. *British journal of haematology* 2014;167:327-36.
49. 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. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2005;23:4643-51.
50. Bodet-Milin C, Kraeber-Bodere F, Moreau P, Campion L, Dupas B, Le Gouill S. Investigation of FDG-PET/CT imaging to guide biopsies in the detection of histological transformation of indolent lymphoma. *Haematologica* 2008;93:471-2.
51. Lossos C, Ferrell A, Duncan R, Lossos IS. Association between non-Hodgkin lymphoma and renal cell carcinoma. *Leukemia & lymphoma* 2011;52:2254-61.
52. Yoshikawa K, Okazaki IM, Eto T, et al. AID enzyme-induced hypermutation in an actively transcribed gene in fibroblasts. *Science* 2002;296:2033-6.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

53. 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. *Nature genetics* 2014;46:176-81.
54. Pasqualucci L, Khiabani H, Fangazio M, et al. Genetics of follicular lymphoma transformation. *Cell reports* 2014;6:130-40.
55. 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;113:3553-7.
56. 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;116:1489-97.
57. Loeffler M, Kreuz M, Haake A, et al. Genomic and epigenomic co-evolution in follicular lymphomas. *Leukemia* 2015;29:456-63.
58. Bodor C, O'Riain C, Wrench D, et al. EZH2 Y641 mutations in follicular lymphoma. *Leukemia* 2011;25:726-9.
59. Morin RD, Mendez-Lago M, Mungall AJ, et al. Frequent mutation of histone-modifying genes in non-Hodgkin lymphoma. *Nature* 2011;476:298-303.
60. Davis RE, Ngo VN, Lenz G, et al. Chronic active B-cell-receptor signalling in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature* 2010;463:88-92.
61. Lenz G, Davis RE, Ngo VN, et al. Oncogenic CARD11 mutations in human diffuse large B cell lymphoma. *Science* 2008;319:1676-9.
62. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 2000;403:503-11.
63. Lenz G, Staudt LM. Aggressive lymphomas. *The New England journal of medicine* 2010;362:1417-29.
64. Pasqualucci L, Dominguez-Sola D, Chiarenza A, et al. Inactivating mutations of acetyltransferase genes in B-cell lymphoma. *Nature* 2011;471:189-95.
65. Rossi D, Gaidano G. Richter syndrome: molecular insights and clinical perspectives. *Hematological oncology* 2009;27:1-10.
66. Timar B, Fulop Z, Csernus B, et al. Relationship between the mutational status of VH genes and pathogenesis of diffuse large B-cell lymphoma in Richter's syndrome. *Leukemia* 2004;18:326-30.
67. Tsimberidou AM, Keating MJ. Richter syndrome: biology, incidence, and therapeutic strategies. *Cancer* 2005;103:216-28.
68. Rossi D, Spina V, Deambrogi C, et al. The genetics of Richter syndrome reveals disease heterogeneity and predicts survival after transformation. *Blood* 2011;117:3391-401.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

69. Rodríguez D, Bretones G, Arango JR, et al. Molecular pathogenesis of CLL and its evolution. *International journal of hematology* 2015;101:219-28.
70. Nadeu F, Delgado J, Royo C, et al. Clinical impact of clonal and subclonal TP53, SF3B1, BIRC3, NOTCH1 and ATM mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2016.
71. Landau DA, Carter SL, Stojanov P, et al. Evolution and impact of subclonal mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Cell* 2013;152:714-26.
72. Landau DA, Tausch E, Taylor-Weiner AN, et al. Mutations driving CLL and their evolution in progression and relapse. *Nature* 2015;526:525-30.
73. Puente XS, Bea S, Valdes-Mas R, et al. Non-coding recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature* 2015;526:519-24.
74. Fabbri G, Khiabani H, Holmes AB, et al. Genetic lesions associated with chronic lymphocytic leukemia transformation to Richter syndrome. *The Journal of experimental medicine* 2013;210:2273-88.
75. Villamor N, Conde L, Martínez-Trillos A, et al. NOTCH1 mutations identify a genetic subgroup of chronic lymphocytic leukemia patients with high risk of transformation and poor outcome. *Leukemia* 2013;27:1100-6.
76. Royo C, Salaverria I, Hartmann EM, Rosenwald A, Campo E, Bea S. The complex landscape of genetic alterations in mantle cell lymphoma. *Seminars in cancer biology* 2011;21:322-34.
77. Salaverria I, Zettl A, Bea S, et al. Specific secondary genetic alterations in mantle cell lymphoma provide prognostic information independent of the gene expression-based proliferation signature. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2007;25:1216-22.
78. Davies AJ, Rosenwald A, Wright G, et al. Transformation of follicular lymphoma to diffuse large B-cell lymphoma proceeds by distinct oncogenic mechanisms. *British journal of haematology* 2007;136:286-93.
79. Palomero T, Lim WK, Odom DT, et al. NOTCH1 directly regulates c-MYC and activates a feed-forward-loop transcriptional network promoting leukemic cell growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006;103:18261-6.
80. Herranz D, Ambesi-Impiombato A, Palomero T, et al. A NOTCH1-driven MYC enhancer promotes T cell development, transformation and acute lymphoblastic leukemia. *Nature medicine* 2014;20:1130-7.
81. Kulis M, Heath S, Bibikova M, et al. Epigenomic analysis detects widespread gene-body DNA hypomethylation in chronic lymphocytic leukemia. *Nature genetics* 2012;44:1236-42.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

82. Office IDAC, the IIDAC. Analysis of five years of controlled access and data sharing compliance at the International Cancer Genome Consortium. *Nature genetics* 2016;48:224-5.
83. Queiros AC, Villamor N, Clot G, et al. A B-cell epigenetic signature defines three biologic subgroups of chronic lymphocytic leukemia with clinical impact. *Leukemia* 2015;29:598-605.
84. Catovsky D, Matutes E. Splenic lymphoma with circulating villous lymphocytes/splenic marginal-zone lymphoma. *Seminars in hematology* 1999;36:148-54.
85. Dungarwalla M, Appiah-Cubi S, Kulkarni S, et al. High-grade transformation in splenic marginal zone lymphoma with circulating villous lymphocytes: the site of transformation influences response to therapy and prognosis. *British journal of haematology* 2008;143:71-4.
86. Mateo M, Mollejo M, Villuendas R, et al. 7q31-32 allelic loss is a frequent finding in splenic marginal zone lymphoma. *The American journal of pathology* 1999;154:1583-9.
87. Sander CA, Yano T, Clark HM, et al. p53 mutation is associated with progression in follicular lymphomas. *Blood* 1993;82:1994-2004.
88. Peker D, Quigley B, Qin D, Papenhausen P, Zhang L. Burkitt lymphoma arising from lymphoplasmacytic lymphoma following acquisition of MYC translocation and loss of the ETV6 tumor suppressor gene. *Archives of pathology & laboratory medicine* 2013;137:130-3.
89. 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. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2008;26:4587-94.
90. Coiffier B, Lepage E, Briere J, et al. CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. *The New England journal of medicine* 2002;346:235-42.
91. Philip T, Guglielmi C, Hagenbeek A, et al. Autologous bone marrow transplantation as compared with salvage chemotherapy in relapses of chemotherapy-sensitive non-Hodgkin's lymphoma. *The New England journal of medicine* 1995;333:1540-5.
92. 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. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2013;31:1164-71.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

93. Wirk B, Fenske TS, Hamadani M, et al. Outcomes of hematopoietic cell transplantation for diffuse large B cell lymphoma transformed from follicular lymphoma. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 2014;20:951-9.
94. Villa D, Crump M, Keating A, Panzarella T, Feng B, Kuruvilla J. Outcome of patients with transformed indolent non-Hodgkin lymphoma referred for autologous stem-cell transplantation. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 2013;24:1603-9.
95. Ban-Hoefen M, Kelly JL, Bernstein SH, et al. High-dose therapy and autologous stem cell transplant for transformed non-Hodgkin lymphoma in the rituximab era. *Leukemia & lymphoma* 2012;53:830-5.
96. Gisselbrecht C, Glass B, Mounier N, et al. Salvage regimens with autologous transplantation for relapsed large B-cell lymphoma in the rituximab era. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2010;28:4184-90.
97. Smith SD, Bolwell BJ, Advani AS, et al. High rate of survival in transformed lymphoma after autologous stem cell transplant: pathologic analysis and comparison with de novo diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia & lymphoma* 2009;50:1625-31.
98. Ban-Hoefen M, Vanderplas A, Crosby-Thompson AL, et al. Transformed non-Hodgkin lymphoma in the rituximab era: analysis of the NCCN outcomes database. *British journal of haematology* 2013;163:487-95.
99. Ratanatharathorn V, Uberti J, Karanes C, et al. Prospective comparative trial of autologous versus allogeneic bone marrow transplantation in patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1994;84:1050-5.
100. Doocey RT, Toze CL, Connors JM, et al. Allogeneic haematopoietic stem-cell transplantation for relapsed and refractory aggressive histology non-Hodgkin lymphoma. *British journal of haematology* 2005;131:223-30.
101. Rezvani AR, Storer B, Maris M, et al. Nonmyeloablative allogeneic hematopoietic cell transplantation in relapsed, refractory, and transformed indolent non-Hodgkin's lymphoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2008;26:211-7.
102. Montoto S. Treatment of patients with transformed lymphoma. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology American Society of Hematology Education Program* 2015;2015:625-30.
103. Hanahan D WR. Hallmarks of cancer: the next generation 2011. A consolidation of the common phenotypes that evolve in neoplastic cells of all types. *Cell* 2011;144:646-74.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

104. Dominguez-Sola D, Kung J, Holmes AB, et al. The FOXO1 Transcription Factor Instructs the Germinal Center Dark Zone Program. *Immunity* 2015;43:1064-74.
105. Kavanaugh SM, White LA, Kolesar JM. Vorinostat: A novel therapy for the treatment of cutaneous T-cell lymphoma. *American journal of health-system pharmacy : AJHP : official journal of the American Society of Health-System Pharmacists* 2010;67:793-7.
106. Roberts AW, Davids MS, Pagel JM, et al. Targeting BCL2 with Venetoclax in Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia. *The New England journal of medicine* 2016;374:311-22.
107. Tsuda K, Tanimoto T, Komatsu T. Lenalidomide plus Rituximab for Mantle-Cell Lymphoma. *The New England journal of medicine* 2016;374:792-3.
108. Do B, Mace M, Rexwinkle A. Idelalisib for treatment of B-cell malignancies. *American journal of health-system pharmacy : AJHP : official journal of the American Society of Health-System Pharmacists* 2016.
109. Wang ML, Rule S, Martin P, et al. Targeting BTK with ibrutinib in relapsed or refractory mantle-cell lymphoma. *The New England journal of medicine* 2013;369:507-16.
110. Burger JA, Tedeschi A, Barr PM, et al. Ibrutinib as Initial Therapy for Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia. *The New England journal of medicine* 2015;373:2425-37.
111. Treon SP, Xu L, Hunter Z. MYD88 Mutations and Response to Ibrutinib in Waldenstrom's Macroglobulinemia. *The New England journal of medicine* 2015;373:584-6.
112. Campbell JK, Matthews JP, Seymour JF, Wolf MM, Juneja SK, Australasian Leukaemia Lymphoma G. Optimum trephine length in the assessment of bone marrow involvement in patients with diffuse large cell lymphoma. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 2003;14:273-6.
113. Bartl R, Frisch B, Kettner G, et al. Histologic classification of lymphoproliferative disorders in the bone marrow. *Bibliotheca haematologica* 1984;98:127.
114. 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;103:275-82.
115. Craig FE, Foon KA. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. *Blood* 2008;111:3941-67.
116. Braylan RC, Orfao A, Borowitz MJ, Davis BH. Optimal number of reagents required to evaluate hemato-lymphoid neoplasias: results of an international consensus meeting. *Cytometry* 2001;46:23-7.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

117. van Dongen JJ, Lhermitte L, Bottcher S, et al. EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia* 2012;26:1908-75.
118. Langerak AW, Groenen PJ, Bruggemann M, et al. EuroClonality/BIOMED-2 guidelines for interpretation and reporting of Ig/TCR clonality testing in suspected lymphoproliferations. *Leukemia* 2012;26:2159-71.
119. Fullwood MJ, Wei CL, Liu ET, Ruan Y. Next-generation DNA sequencing of paired-end tags (PET) for transcriptome and genome analyses. *Genome research* 2009;19:521-32.
120. Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 2009;25:1754-60.
121. Shen Y, Wan Z, Coarfa C, et al. A SNP discovery method to assess variant allele probability from next-generation resequencing data. *Genome research* 2010;20:273-80.
122. Stenson PD, Mort M, Ball EV, et al. The Human Gene Mutation Database: 2008 update. *Genome medicine* 2009;1:13.
123. Bamford S, Dawson E, Forbes S, et al. The COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) database and website. *British journal of cancer* 2004;91:355-8.
124. Delgado J, Pereira A, Villamor N, Lopez-Guillermo A, Rozman C. Survival analysis in hematologic malignancies: recommendations for clinicians. *Haematologica* 2014;99:1410-20.
125. 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;126:851-7.
126. Sehn LH, Berry B, Chhanabhai M, et al. The revised International Prognostic Index (R-IPI) is a better predictor of outcome than the standard IPI for patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *Blood* 2007;109:1857-61.
127. Jackson AE LJ, Bartlett NL, Cashen AF. Transformed follicular lymphoma: is early autologous stem cell transplantation indicated in the modern era? *Ann Hematol Oncol* 2014;1:1002.
128. Cortes-Romera M, Sabate-Llobera A, Mercadal-Vilchez S, et al. Bone marrow evaluation in initial staging of lymphoma: 18F-FDG PET/CT versus bone marrow biopsy. *Clinical nuclear medicine* 2014;39:e46-52.
129. 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;229:1390-3.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

130. Weiss LM, Warnke RA, Sklar J, Cleary ML. Molecular analysis of the t(14;18) chromosomal translocation in malignant lymphomas. *The New England journal of medicine* 1987;317:1185-9.
131. Rosenwald A, Wright G, Chan WC, et al. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *The New England journal of medicine* 2002;346:1937-47.
132. 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. *The American journal of pathology* 2004;165:159-66.
133. Visco C, Tzankov A, Xu-Monette ZY, et al. Patients with diffuse large B-cell lymphoma of germinal center origin with BCL2 translocations have poor outcome, irrespective of MYC status: a report from an International DLBCL rituximab-CHOP Consortium Program Study. *Haematologica* 2013;98:255-63.
134. Tombor B, Rundell K, Oltvai ZN. Bcl-2 promotes premature senescence induced by oncogenic Ras. *Biochemical and biophysical research communications* 2003;303:800-7.
135. Crescenzi E, Palumbo G, Brady HJ. Bcl-2 activates a programme of premature senescence in human carcinoma cells. *The Biochemical journal* 2003;375:263-74.
136. Testoni M, Kwee I, Greiner TC, et al. Gains of MYC locus and outcome in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *British journal of haematology* 2011;155:274-7.
137. Mossafa H, Damotte D, Jenabian A, et al. Non-Hodgkin's lymphomas with Burkitt-like cells are associated with c-Myc amplification and poor prognosis. *Leukemia & lymphoma* 2006;47:1885-93.
138. Green TM, Nielsen O, de Stricker K, Xu-Monette ZY, Young KH, Moller MB. High levels of nuclear MYC protein predict the presence of MYC rearrangement in diffuse large B-cell lymphoma. *The American journal of surgical pathology* 2012;36:612-9.
139. Jardin F, Coiffier B. TP53 and outcome in DLBCL: not only the coding region. *Blood* 2013;121:4433-4.
140. Khan AB, Barrington SF, Mikhaeel NG, et al. PET-CT staging of DLBCL accurately identifies and provides new insight into the clinical significance of bone marrow involvement. *Blood* 2013;122:61-7.
141. Jerusalem G, Beguin Y, Najjar F, et al. Positron emission tomography (PET) with 18F-fluorodeoxyglucose (18F-FDG) for the staging of low-grade non-Hodgkin's lymphoma (NHL). *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 2001;12:825-30.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

142. Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *The New England journal of medicine* 2012;366:883-92.
143. Corre J, Munshi N, Avet-Loiseau H. Genetics of multiple myeloma: another heterogeneity level? *Blood* 2015;125:1870-6.
144. Keats JJ, Chesi M, Egan JB, et al. Clonal competition with alternating dominance in multiple myeloma. *Blood* 2012;120:1067-76.
145. Mullighan CG, Phillips LA, Su X, et al. Genomic analysis of the clonal origins of relapsed acute lymphoblastic leukemia. *Science* 2008;322:1377-80.
146. Schuh A, Becq J, Humphray S, et al. Monitoring chronic lymphocytic leukemia progression by whole genome sequencing reveals heterogeneous clonal evolution patterns. *Blood* 2012;120:4191-6.
147. Treon SP, Xu L, Yang G, et al. MYD88 L265P somatic mutation in Waldenstrom's macroglobulinemia. *The New England journal of medicine* 2012;367:826-33.
148. Jimenez C, Sebastian E, Chillon MC, et al. MYD88 L265P is a marker highly characteristic of, but not restricted to, Waldenstrom's macroglobulinemia. *Leukemia* 2013;27:1722-8.
149. Poulain S, Roumier C, Venet-Caillault A, et al. Genomic Landscape of CXCR4 Mutations in Waldenstrom Macroglobulinemia. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2016;22:1480-8.
150. Lim KH, Yang Y, Staudt LM. Pathogenetic importance and therapeutic implications of NF-kappaB in lymphoid malignancies. *Immunological reviews* 2012;246:359-78.
151. Aplan PD. Chromosomal translocations involving the MLL gene: molecular mechanisms. *DNA repair* 2006;5:1265-72.
152. Kandoth C, McLellan MD, Vandin F, et al. Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature* 2013;502:333-9.
153. Pasqualucci L, Trifonov V, Fabbri G, et al. Analysis of the coding genome of diffuse large B-cell lymphoma. *Nature genetics* 2011;43:830-7.
154. Parsons DW, Li M, Zhang X, et al. The genetic landscape of the childhood cancer medulloblastoma. *Science* 2011;331:435-9.
155. Rao RC, Dou Y. Hijacked in cancer: the KMT2 (MLL) family of methyltransferases. *Nature reviews Cancer* 2015;15:334-46.
156. Lee JE, Wang C, Xu S, et al. H3K4 mono- and di-methyltransferase MLL4 is required for enhancer activation during cell differentiation. *eLife* 2013;2:e01503.
157. Kaikkonen MU, Spann NJ, Heinz S, et al. Remodeling of the enhancer landscape during macrophage activation is coupled to enhancer transcription. *Molecular cell* 2013;51:310-25.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

158. Zhang J, Dominguez-Sola D, Hussein S, et al. Disruption of KMT2D perturbs germinal center B cell development and promotes lymphomagenesis. *Nature medicine* 2015;21:1190-8.
159. Saini V, Marchese A, Majetschak M. CXC chemokine receptor 4 is a cell surface receptor for extracellular ubiquitin. *The Journal of biological chemistry* 2010;285:15566-76.
160. Majetschak M. Extracellular ubiquitin: immune modulator and endogenous opponent of damage-associated molecular pattern molecules. *Journal of leukocyte biology* 2011;89:205-19.
161. Bernhagen J, Krohn R, Lue H, et al. MIF is a noncognate ligand of CXC chemokine receptors in inflammatory and atherogenic cell recruitment. *Nature medicine* 2007;13:587-96.
162. To LB, Levesque JP, Herbert KE. How I treat patients who mobilize hematopoietic stem cells poorly. *Blood* 2011;118:4530-40.
163. Balabanian K, Levoye A, Klemm L, et al. Leukocyte analysis from WHIM syndrome patients reveals a pivotal role for GRK3 in CXCR4 signaling. *The Journal of clinical investigation* 2008;118:1074-84.
164. Hunter ZR, Xu L, Yang G, et al. The genomic landscape of Waldenstrom macroglobulinemia is characterized by highly recurring MYD88 and WHIM-like CXCR4 mutations, and small somatic deletions associated with B-cell lymphomagenesis. *Blood* 2014;123:1637-46.
165. Treon SP, Cao Y, Xu L, Yang G, Liu X, Hunter ZR. Somatic mutations in MYD88 and CXCR4 are determinants of clinical presentation and overall survival in Waldenstrom macroglobulinemia. *Blood* 2014;123:2791-6.
166. Schop RF, Jalal SM, Van Wier SA, et al. Deletions of 17p13.1 and 13q14 are uncommon in Waldenstrom macroglobulinemia clonal cells and mostly seen at the time of disease progression. *Cancer genetics and cytogenetics* 2002;132:55-60.
167. Sciammas R, Davis MM. Modular nature of Blimp-1 in the regulation of gene expression during B cell maturation. *Journal of immunology* 2004;172:5427-40.
168. Turner CA, Jr., Mack DH, Davis MM. Blimp-1, a novel zinc finger-containing protein that can drive the maturation of B lymphocytes into immunoglobulin-secreting cells. *Cell* 1994;77:297-306.
169. Braggio E, Philipsborn C, Novak A, Hodge L, Ansell S, Fonseca R. Molecular pathogenesis of Waldenstrom's macroglobulinemia. *Haematologica* 2012;97:1281-90.
170. Lossos IS. BLIMP1 against lymphoma: The verdict is reached. *Cancer cell* 2010;18:537-9.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

171. Mandelbaum J, Bhagat G, Tang H, et al. BLIMP1 is a tumor suppressor gene frequently disrupted in activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma. *Cancer cell* 2010;18:568-79.
172. Pasqualucci L, Neumeister P, Goossens T, et al. Hypermutation of multiple proto-oncogenes in B-cell diffuse large-cell lymphomas. *Nature* 2001;412:341-6.
173. Lerijani M FD, Basit W, Martin A. The mutation spectrum of purified AID is similar to the mutability index in Ramos cells and in *ung*<sup>-/-</sup> *msh2*<sup>-/-</sup> mice. *Immunogenetics* 2005;56:840-5.
174. Sagar V, Caldarola S, Aria V, et al. PIM1 destabilization activates a p53-dependent response to ribosomal stress in cancer cells. *Oncotarget* 2016.