



GRADO EN MEDICINA

Trabajo fin de grado

DIAGNÓSTICO DEL LINFOMA B NO HODGKIN
AGRESIVO. ESTADO DEL ARTE

Diagnosis of aggressive B-cell Non-Hodgkin
Lymphoma. State of the art

Autor/a: Lola Fernández Viejo

Director/a: Dr. Santiago Montes Moreno

Santander. Junio 2017

Contenido	
Resumen	3
Abstract.....	3
Introducción	4
Material y métodos	14
Resultados.....	17
Discusión.....	24
Conclusión.....	26
Bibliografía	28

DIAGNÓSTICO DEL LINFOMA B NO HODGKIN AGRESIVO. ESTADO DEL ARTE

Resumen

Introducción: El linfoma difuso de células B grandes (LBDCG) es una entidad clínica muy heterogénea. Numerosos estudios tratan de identificar marcadores biológicos con valor pronóstico o posibles dianas terapéuticas. El objetivo de este trabajo es caracterizar desde el punto de vista del fenotipo, mediante inmunohistoquímica, una serie de 53 biopsias de pacientes con LBDCG.

Material y métodos: se realizó una revisión bibliográfica de 18 artículos originales. Se analizó una serie retrospectiva de muestras con el diagnóstico de LBDCG. Se confirmó el diagnóstico y se hizo un estudio inmunohistoquímico de 53 casos de LBDCG. Se realizó un análisis estadístico de tipo descriptivo.

Resultados: Se dividieron los casos en GCB (centro germinal de células B) (62%) y no-GCB (38%), según el algoritmo de Hans. Un 15% de casos fueron positivos para MYC y BCL2. Se observó un caso EBV+ (2%). 9 (17%) casos presentaban células CD30+. 3 (6%) casos tuvieron al menos un 50% de células positivas para p53. PDL-1 fue positivo en 6 casos (11%). PD1 en células tumorales fue positivo en 6 casos (11%). 2 casos se marcaron para CD5 (4%). No se ha encontrado una asociación estadística entre la expresión de PDL-1 y la coexpresión de MYC y BCL2 con el fenotipo GCB-no-GCB.

Discusión: La inmunohistoquímica es una técnica factible para el fenotipado de los casos de LBDCG. Debido a la heterogeneidad de los casos LBDCG resulta útil el estudio inmunohistoquímico en busca de marcadores biológicos o dianas terapéuticas.

Palabras clave: linfoma difuso de células B grande, GCB, no-GCB, doble positivo, algoritmo inmunohistoquímico.

Abstract

Introduction: Diffuse large B cell lymphoma (DLBCL) is a heterogeneous entity. Several studies seek to identify biological markers with prognostic power or potential therapeutic targets. The main goal of the following paper is to characterize the phenotype by immunohistochemistry of a series of 53 biopsy samples with a diagnosis of DLBCL.

Material and methods: 18 original articles were reviewed. A retrospective series of samples with the diagnosis of DLBCL was analyzed. The diagnosis was confirmed, and immunohistochemistry with monoclonal antibodies against CD20, CD30, BCL2, CD10, BCL6, CD30, LMP1, EBV, Ki67, p53, c-Myc, CD5, MUM1, PD1, PDL-1, and PD1 tumor-infiltrating lymphocytes was performed in 53 tumor samples. A descriptive statistical analysis was done.

Results: the samples were divided into GCB (62) and non-GCB (38) based on Hans algorithm. 15% of the cases were positive for MYC and BCL2. One EBV+ case was

observed (2%). 9 cases(17%) showed CD30+ cells. 3 (6%) cases had at least 50% of positive cells for p53. PDL-1 was positive in 6 cases (11%). PD1 in tumoral cells was positive in 6 cases (11%). 2 (4%) cases were positive for CD5. No statistic association was found between PDL-1 expression and Bcl-2 and Myc coexpression, and the phenotype GCB or non-GCB.

Discussion: Immunohistochemistry is a feasible technique for the phenotyping of DLBCL cases. Due to the heterogeneity of DLBCL cases, the immunohistochemical study is useful in the search for biological markers or therapeutic targets.

Key words: diffuse large B cell lymphoma, GCB, non-GCB, double positive, immunohistochemical algorithm.

Introducción

El linfoma difuso de células B grandes (LBDCG) es el subtipo más prevalente de neoplasias de células B maduras en todo el mundo, representando aproximadamente el 30% de todos los linfomas no Hodgkin. LBDCG es muy heterogéneo, tanto clínicamente como biológicamente. Se ha observado que no todos los pacientes responden igual al tratamiento y no tienen el mismo pronóstico. La base del tratamiento para LBDCG fue durante mucho tiempo CHOP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisona). En los últimos años se ha añadido rituximab, por lo que el tratamiento se basa en la terapia con R-CHOP, con una mejoría considerable en la supervivencia de los pacientes. Sin embargo, las remisiones duraderas sólo se logran en el 40-50% de los pacientes. Por ello es importante identificar en el momento del diagnóstico a los pacientes que pueden beneficiarse de terapias más agresivas o experimentales.

Convencionalmente, el pronóstico de los pacientes con linfoma B difuso de células grandes se establece mediante del Índice Pronóstico Internacional (IPI), desarrollado a partir de un estudio multicéntrico de pacientes con linfomas agresivos que recibieron quimioterapia basada en antraciclinas (antes de que se incorporara el rituximab al tratamiento). Este sistema tiene en cuenta cinco factores fuertemente ligados con la respuesta al tratamiento: edad, estado Ann Arbor, estado ECOG (del inglés *Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status*), el nivel de lactato deshidrogenasa y el número de áreas extranodales infiltradas. Según la cantidad de factores adversos, el paciente se estadifica en un grupo de riesgo; cuantos más factores adversos presente, es menor la probabilidad de supervivencia global (OS, del inglés *Overall Survival*) a cinco años.

Aunque el índice pronóstico internacional (IPI) ha demostrado ser una herramienta clínica muy útil y está ampliamente utilizado para estratificar a los pacientes, se basa exclusivamente en variables clínicas y, por tanto, no logra captar la heterogeneidad biológica de LBDCG y no identifica posibles terapias dirigidas.

Para estudiar la heterogeneidad biológica, y así encontrar terapias más dirigidas para los distintos subtipos de linfomas, se comenzó a estudiar el valor pronóstico de varias

proteínas individuales. En los últimos años, los estudios biológicos han demostrado que el LBDCG no es una sola enfermedad, sino un grupo de trastornos con sistemas específicos de señalización, algunos de los cuales se ha demostrado que se benefician de nuevos tratamientos específicos. El perfil de expresión genética (GEP) (análisis del cDNA) ha identificado tres subtipos de LBDCG: el subtipo de centro germinal de células B (GCB) y los subtipos LBDCG de células B activadas (ABC), y los casos no clasificados (~ 10%). Los pacientes con el subtipo GCB tienden a tener una mejor supervivencia que los casos del subtipo ABC en pacientes tratados con quimioterapia, con o sin rituximab. El grupo de tipo 3 es heterogéneo y no está bien definido.

Los mecanismos de la transformación maligna de los dos subgrupos (GCB y ABC) implican vías distintas y específicas, como el reagrupamiento de BCL2 y la amplificación C-REL observada principalmente en GCB-LBDCG, y la activación constitutiva de la vía NF- κ B que caracteriza a los casos ABC-LBDCG. Estos nuevos conocimientos sobre la patogénesis de los subgrupos LBDCG están permitiendo en la investigación el descubrimiento de terapias más dirigidas.

Debido a que la tecnología GEP es costosa y generalmente no disponible en la práctica clínica diaria, un método más sencillo y más ampliamente disponible para subclasificar los casos de LBDCG en grupos pronósticamente significativos, sería la inmunohistoquímica (IHC). La inmunohistoquímica tendría amplia aplicabilidad y utilidad en la práctica clínica de rutina. Por ello múltiples estudios están dirigidos a la búsqueda de un algoritmo que a través de las pruebas inmunohistoquímicas pueda clasificar a los LBDCG en concordancia con la clasificación con GEP.

Las ventajas de la inmunohistoquímica son varias; la inmunohistoquímica permite la visualización directa y, por lo tanto, la evaluación de las células neoplásicas. Por otra parte, los métodos de expresión genética requieren una muestra de tumor fresco o congelado, que no está disponible en muchos casos, y a veces se falla al dar los resultados. Además, a menos que se realice una microdissección, el tejido sometido al análisis de cDNA contiene no sólo tumor sino también tejido no tumoral asociado. Si hay una cantidad significativa de tejido no tumoral presente, los datos de expresión de cDNA pueden no reflejar el perfil de expresión genética del tumor. La evaluación directa de las células tumorales mediante microscopía evita la inclusión de elementos no neoplásicos, lo cual es un inconveniente inevitable del GEP y de la transcripción inversa-PCR.

Los métodos de tinción con IHC ya están disponibles en la mayoría de los laboratorios de patología, haciendo que un modelo de tinción IHC simple sea más práctico para su uso generalizado.

Además la IHC se torna aún más práctica con la posibilidad de utilizar la tecnología TMA (tissue microarray), que es una herramienta rentable que permite la evaluación rápida de la tinción inmunohistoquímica de múltiples tumores en una sola sección de tejido.

Algoritmos inmunohistoquímicos

Buscando algoritmos inmunohistoquímicos para reproducir la clasificación de GEP se llegó a distintos tipos de algoritmos como los de Hans, Visco-Young y Choi. Estos algoritmos han mostrado la mayor concordancia con la clasificación de célula de origen

(COO) definida por GEP.

Hans y colaboradores desarrollaron un algoritmo inmunohistoquímico con una concordancia próxima al 80% con la clasificación de expresión genética (GEP) del linfoma difuso de células B grandes (LBDCG). Desde entonces, se han desarrollado nuevos anticuerpos específicos para las células B del centro germinal, lo que podría mejorar el rendimiento de un algoritmo de inmuno-tinción.

En el estudio de Hans et al. (*Hans et al Blood, 2004*) se crearon bloques de microarray de tejido (TMA) a partir de 152 casos de LBDCG, 142 de los cuales habían sido evaluados con éxito por microarray de cDNA (75 GCB, 41 ABC y 26 tipo 3). Las secciones se tiñeron con anticuerpos contra CD10, bcl-6, MUM1, FOXP1, ciclina D2 y bcl-2. La expresión de bcl-6 ($P < .001$) o CD10 ($P .019$) se asoció con mejor supervivencia global (OS), mientras que la expresión de MUM1 ($P .009$) o ciclina D2 ($P < .001$) se asoció con un pronóstico peor. Los casos fueron subclassificados utilizando la expresión de CD10, bcl-6 y MUM1. 64 casos (42%) se consideraron GCB y 88 casos (58%) no-GCB. La OS a 5 años para el grupo GCB fue de 76% en comparación con sólo el 34% para el grupo no-GCB ($P < .001$). Esta información es similar a los resultados obtenidos utilizando microarray de cDNA. Bcl-2 y ciclina D2 fueron predictores adversos en el grupo no-GCB. En el análisis multivariante, una alta puntuación del índice pronóstico internacional (3-5) y el fenotipo no-GCB fueron predictores adversos independientes ($P < .0001$).

Considerando la clasificación de los microarrays de cDNA como gold standar, la sensibilidad de la TMA fue de 71% para el grupo GCB y 88% para el grupo no-GCB. El valor predictivo positivo de la clasificación de TMA fue del 87% para el grupo GCB y del 73% para el grupo no-GCB. En comparación con los resultados de microarrays cDNA, se cree que 30 pacientes han sido mal clasificadas utilizando TMA. Además esta clasificación predice la supervivencia de manera similar a cDNA microarrays.

En resumen, la inmunohistoquímica se puede utilizar para determinar los subtipos GCB y no GCB de LBDCG y predecir la supervivencia de manera similar a la técnica cDNA microarray utilizando el algoritmo de Hans.

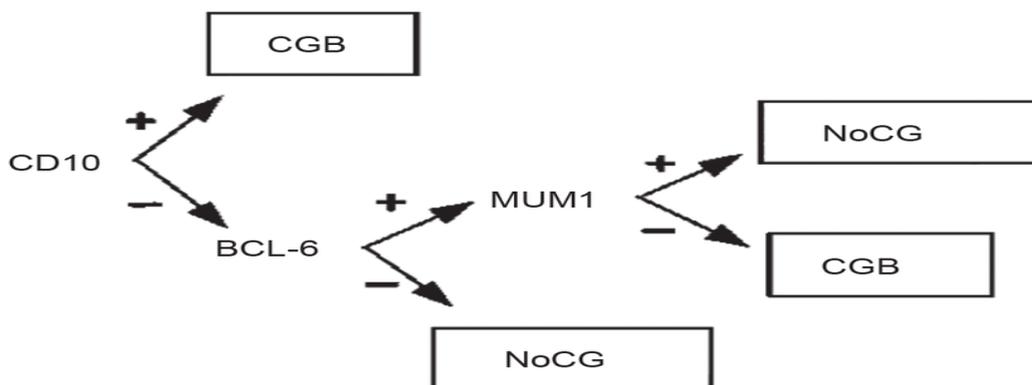


Figura 1. Adaptado de Hans et al, 2004. Algoritmo para la subclasificación de los casos de LBDCG en función de la expresión de CD10, BCL6 y MUM1. Un marcador se considera positivo cuando >30% de las células tumorales expresan la proteína.

Posteriormente Choi et al. (Choi et al. *Clin Cancer Res.* 2009) desarrollaron un algoritmo basado en la expresión de cinco biomarcadores. Comparado con el algoritmo de Hans, el algoritmo de Choi integró el análisis de dos nuevas moléculas: la proteína de la caja de forkhead P1 (FOXP1) y GCET1 (*Germinal center expressed transcript 1*), que permitió una mejor discriminación entre los casos LBDCG con subtipo GCB y ABC.

En el estudio de Choi et al. se obtuvo un nuevo algoritmo utilizando GCET1, CD10, BCL6, MUM1 y FOXP1 que se aproximó mucho a la clasificación GEP, con un 93% de concordancia. El nuevo algoritmo predijo una supervivencia global de 3 años del conjunto de validación [GCB (87%) versus ABC (44%); $P < 0,001$], similar al poder predictivo de la clasificación GEP.

Se ha construido otro algoritmo efectivo, definido como el algoritmo Visco-Young (Visco et al. *Leukemia.* 2012), que coincide con alta concordancia con la clasificación de GEP (92,6%). El algoritmo muestra un fuerte valor pronóstico independiente que es casi equivalente a la del análisis de GEP en una gran cohorte de casos LBDCG tratados con R-CHOP.

En el estudio de Visco et al. se tiñeron las muestras con anticuerpos reactivos para CD10, GCET1, FOXP1, MUM1 y BCL6 y los casos se clasificaron siguiendo un razonamiento de pasos secuenciales de diferenciación de células B. Se desarrolló un algoritmo basado en la expresión de CD10, FOXP1 y BCL6, que tenía una estructura más simple que otros algoritmos propuestos recientemente, y un 92.6% de concordancia con la clasificación GEP. En el análisis multivariante, tanto el índice pronóstico internacional como el algoritmo propuesto fueron predictores significativos independientes de supervivencia libre de progresión (PFS, del inglés progression free survival) y supervivencia global (OS). En conclusión, este algoritmo predice eficazmente el pronóstico de los pacientes LBDCG, coincidiendo con la clasificación de GEP en la etapa del tratamiento con R-CHOP.

En otro estudio, (Meyer et al. *J Clin Oncol.* 2011) se desarrolló un algoritmo que se relacionó con la expresión de cinco marcadores: CD10, GCET1, FOXP1, MUM1 y LMO2. Sin embargo, en un estudio reciente (Gutiérrez-García et al. *Blood,* 2011), cuando se compararon estos algoritmos con GEP y se estudió el valor pronóstico, en una cohorte independiente de pacientes, los resultados no se correlacionaron con GEP y mostraron un poder pronóstico deficiente.

En un intento de confirmar que los algoritmos de IHC pueden utilizarse para estratificar pronósticamente a los pacientes LBDCG en el estudio de Ana Battle et al. (Ana Battle López et al., *Oncotarget,* 2016), se compara los algoritmos de Hans, Choi y Visco-Young en una cohorte retrospectiva de 297 muestras diagnósticas de pacientes con LBDCG tratados con R-CHOP. Comparando la clasificación con GEP con los resultados de los algoritmos de Hans, Choi y Visco-Young, se observaron discrepancias en la clasificación de COO en un 14%, 13% y 8% de los pacientes, respectivamente. Los tres algoritmos identificaban subgrupos de pacientes con diferente pronóstico en relación con OS y PFS.

Además, para establecer si la desregulación de oncogenes específicos puede clasificar los subtipos LBDCG basados en COO, aportando información pronóstica significativa, se

realizó FISH de BCL6, BCL2, IRF4 y MYC y se evaluó la expresión de las proteínas MYC, BCL2, BCL6 y pSTAT3 en las mismas muestras.

Se detectaron reordenamientos de MYC en el 7% de los casos, de los cuales sólo el 30% presentó otras anomalías citogenéticas. El impacto negativo en el pronóstico de la alteración aislada de MYC, como una única anomalía citogenética, se restringió a los pacientes con un fenotipo GCB y se asoció con una menor PFS. Aunque la implicación pronóstica del hallazgo no se confirmó en el análisis multivariante, los resultados del estudio confirman que el pronóstico favorable del subtipo GCB LBDCG es superado por el efecto negativo de los reordenamientos de MYC. Por esta razón, una investigación sistemática de los reordenamientos MYC, al menos dentro del subgrupo GCB, sería útil. En conjunto, estos hallazgos sugieren que los pacientes con LBDCG tipo GCB con un reordenamiento de MYC probablemente se beneficiarían de estrategias de tratamiento distintas de R-CHOP, como por ejemplo, R-DAEPOCH o añadir inhibidores de MYC.

Los resultados del estudio de Ana Batlle et al. concluyen con la confirmación de que la clasificación COO basada en IHC es un enfoque reproducible y práctico para estratificar los pacientes diagnosticados de LBDCG en subtipo GCB y no GCB, y que este último subgrupo se asocia con un mayor riesgo de progresión y menor supervivencia cuando los pacientes son tratados con R-CHOP.

Además determinaron que es interesante la búsqueda de nuevas terapias ajustada a los marcadores que se expresan en los distintos subtipos de linfomas. Especialmente es interesante la búsqueda de nuevas medidas terapéuticas en los subtipo no-GCB con puntuaciones IPI elevados o aquellos que expresan Bcl-2.

Supervivencia

En un meta-análisis se compararon distintos estudios para ver la correlación entre los subtipos clasificados por GEP e IHC y la supervivencia de cada subtipo. Se llegó a la conclusión de que los pacientes designados como GCB LBDCG mediante GEP se comportaron significativamente mejor en términos de supervivencia global que aquellos casos ABC LBDCG (hazard ratio, 1.85; $P < .0001$). Por el contrario, los algoritmos de Hans y Choi no lograron identificar diferencias significativas en la supervivencia global entre los grupos GCB y no GCB, aunque si se encontraron diferencias significativas en supervivencia libre de progresión (PFS). Por lo tanto este estudio indica que la clasificación mediante GEP sigue siendo el método preferido para predecir el curso de la enfermedad de un paciente, y tomar las decisiones relativas a las opciones de tratamiento, y que los algoritmos basados en IHC tienen valor pronósticos cuando se refiere a la PFS. (*Jay A et al. Read 2014*)

Linfomas con coexpresión de MYC y BCL2 mediante IHC.

LBDCG con translocaciones en Myc y Bcl-2 da lugar a un linfoma doble hit (DH). Aproximadamente el 5% de los linfomas difusos de células B grandes (LBDCG) son linfomas doble hit (DHLs), que se característico por una respuesta pobre a la terapia convencional y un curso clínico agresivo. Por lo tanto, hay un efecto clínico en la activación combinada de estos dos genes, MYC promueve la proliferación celular y BCL2 bloquea la muerte celular.

En el estudio de Green (*Green et al, JCO 2012*) se investigó el concepto DH y se analizaron los niveles de expresión de ambas proteínas Myc y Bcl-2 en 193 pacientes con LBDCG. Según el estudio la prevalencia de DH fue del 6% por FISH. De ellos el 91% correspondían a linfomas tipo GCB.

Por otro lado en el estudio se examinó el término Doble Positivo (DP). Se denomina DP a aquellos linfomas que presentan un incremento de la expresión proteica de MYC y Bcl-2. Se determinaron como doble positivos aquellos casos que tenían una expresión de Bcl-2 mayor del 70%, y de Myc mayor del 40%. Se observó que un 29% de los tumores estudiados eran doble positivos.

En el estudio se muestra el valor de la inmunohistoquímica en la evaluación de la expresión de Myc y Bcl-2 para la identificación de pacientes con LBDCG doble hit y doble positivo. La expresión de estas dos proteínas estaba fuertemente asociada con mal pronóstico tras la terapia con R-CHOP.

En el estudio de Johnson et al. (*Johnson et al. JCO. 2012*) la prevalencia de casos doble positivos fue del 21%. Al igual que en el estudio de Green et al. se observó una clara relación entre mal pronóstico y la doble positividad. El mal pronóstico de los casos doble positivos no se asocia con los datos IPI y los subtipos GCB o no GCB. En el estudio de Hu et al. (*Hu et al. Blood 2013*) el efecto pronóstico de la coexpresión de Myc y Bcl-2 es independiente de IPI, de la mutación p53 y de los síntomas B. Sí que se asociaron los casos doble positivos más comúnmente con el subgrupo no-GCB (66%). En este último estudio un 34% de los casos fueron DP.

En resumen, los casos de LBDCG DP son una entidad distinta de los casos reconocidos como DH, con una mayor prevalencia y, posiblemente una biología distinta. Los datos sugieren que la sobreexpresión de Myc y Bcl-2 se puede utilizar para identificar pacientes con LBDCG que tienen una alta probabilidad de demostrar una respuesta insatisfactoria al tratamiento estándar y que podrían ser candidatos de nuevas estrategias terapéuticas.

PDL-1

La proteína de muerte celular programada 1 (PD-1), es un miembro de la familia del receptor B7, un receptor inhibidor expresado en la superficie de células T CD4. La unión de PD-1 a su ligando PD-L1, expresada en células presentadoras de antígeno, inhibe la citoquina de producción y la progresión del ciclo celular en las células T y funciona como un punto de control importante en la regulación de las respuestas inmunológicas. En un huésped sano, la señalización PD-1 / PD-L1 regula las respuestas de las células T efectoras y protege del daño de los tejidos.

La expresión de PD-L1 en células tumorales se asocia con mayor progresión tumoral y mal pronóstico. Lo estudiado hasta ahora sugiere que la vía PD-1 / PD-L1 contribuye a la supervivencia de las células tumorales y que la manipulación de esta vía puede ser una modalidad terapéutica aplicable para tratar LBDCG. Sin embargo, las características clinicopatológicas detalladas de PD-L1 + LBDCG todavía no están claras.

PD-L1 + LBDCG (*Kiyasu et al., Blood, 2015*) se asoció significativamente con la presencia de síntomas B (P = .004), niveles elevados de interleucina-2 soluble (P = .0004), con el

índice de pronóstico internacional (IPI) de alto riesgo ($P = 0.04$), y con el subtipo no-GCB ($P = 0,008$). La muerte se produjo en 20 pacientes (59%) con PD-L1 + LBDCG en comparación con 76 pacientes (32%) con PD-L1- LBDCG y se debió principalmente a la progresión del linfoma. Los pacientes con PD-L1 + LBDCG tenían OS inferior comparado con el de los pacientes con PD-L1- LBDCG en la cohorte entera ($P = .0009$).

En el análisis ajustado por edad y sexo se observaron las siguientes variables como factores pronósticos: expresión de PD-L1, estadio clínico avanzado (III o IV), nivel sérico elevado de lactato deshidrogenasa, presencia de sitios extranodales (más de 1), presencia de síntomas B, y ECOG mayor de 1. En este análisis, la expresión de PD-L1 + LBDCG siguió siendo un factor pronóstico significativo ($P = .0323$). Cuando se realizó otro análisis, en el que se incluyeron los síntomas B, el algoritmo de Hans, el IPI y la positividad de PD-L1 como covariables, el impacto de la expresión de PD-L1 para OS fue significativo.

En conclusión, este estudio demuestra que la expresión de PD-L1 en las células tumorales se correlaciona con mal pronóstico. Estos hallazgos apoyan la hipótesis de que la inmunoterapia dirigida a la vía PD-1 / PD-L1 puede beneficiar a los pacientes con LBDCG, aunque las respuestas terapéuticas pueden diferir según los perfiles de expresión PD-L1.

P53

La proteína p53 codificada por el gen TP53 es un supresor tumoral crucial que interviene en la detención del ciclo celular, la reparación del ADN, la apoptosis, la senescencia y la autofagia bajo estrés celular, a través de la actividad dependiente de la transcripción (TA) y la actividad independiente de la transcripción (TIA) en el núcleo y el citoplasma, respectivamente. La disfunción de TP53 está implicada en la linfomagénesis y la progresión de enfermedad, y la función normal de TA y TIA de p53 es crucial para la supresión tumoral. Mutaciones de TP53 alteran la secuencia y estructura de la proteína p53, e interrumpen su función. Las mutaciones TP53 podrían proporcionar información pronóstica y predictiva para guiar hacia terapias más específicas en los pacientes con linfoma.

El estudio Xu- Monette et al. (Xu-Monette ZY. et al. *Blood*. 2017) y otros han demostrado que la mutación TP53 es un indicador pronóstico independiente de baja supervivencia en los pacientes LBDCG tratados con la quimioterapia CHOP.

En este estudio se muestra una prevalencia de la mutación TP53 del 21,9% en los pacientes diagnosticados de LBDCG, y los patrones de mutación fueron similares a los patrones en algunos otros tipos de cáncer. La mayoría de las mutaciones TP53 fueron mutaciones missense.

El nivel de expresión de la proteína p53 se determinó en 483 pacientes LBDCG usando IHC. Diferentes puntos de corte de las células positivas produjo diferentes sensibilidad y especificidad en el análisis de ROC. Expresiones entre el 10% y el 60% permite dividir a los pacientes en 2 grupos con OS y PFS significativamente diferentes. Sin embargo, la sobreexpresión de p53 determinada por IHC utilizando cortes de 10% a 40% es menos discriminante que el estado de mutación de TP53 para estratificar pacientes en grupos con supervivencia diferente. Aunque un 30% de corte de la expresión de p53 por IHC

tuvo el mayor índice de Youden, un corte del 50% tenía una mayor especificidad, y el mejor valor de P en la estratificación de los pacientes. Por lo tanto, se llegó a la conclusión de que el 50% es el mejor punto de corte de expresión de p53 con el que estratificar a los pacientes LBDCG en la práctica diagnóstica si la secuenciación de TP53 no está disponible.

Virus Epstein-Barr (EBV)

La clasificación de la OMS describe varios tipos especiales de LBDCG, y los casos LBDCG que albergan EBV en pacientes mayores de 50 años se denominó LBDCG EBV-positivos de ancianos, y se definió como una categoría provisional. El EBV- LBDCG de la categoría de ancianos representa el 8-10% de todos los LBDCG en los países asiáticos, pero <5% en los países occidentales. El pronóstico de los pacientes con EBV+ LBDCG sigue siendo pobre, incluso con el tratamiento R-CHOP.

El virus Epstein-Barr es el herpesvirus gamma más común, y ha infectado a más del 90% de todos los adultos. La mayoría de las personas se infectan subclínicamente en la infancia y mantienen una infección latente a lo largo de su vida. El EBV es reactivado por varios estímulos. Las células B infectadas con el virus del Epstein-Barr son usualmente controladas por células T específicas, pero se quedan sin control cuando el huésped es inmunodeficiente. Las células B infectadas con EBV a veces se convierten en líneas celulares linfoblastoides y obtienen una capacidad ilimitada para proliferar. Las linfocitos linfoblastoides causan algunas neoplasias linfoides, incluyendo el linfoma de Burkitt, el linfoma de células T extra natural / linfoma T, la leucemia / linfoma agresivo natural, el linfoma de células T angioinmunoblástico, el linfoma de Hodgkin, los trastornos linfoproliferativos asociados a la inmunodeficiencia y algunos LBDCG.

En el estudio de Sato A et al. (*Sato A et al. Cancer Sci. 2014*) se encontró que 14 de 239 pacientes (5,86%) con diagnóstico de LBDCG fueron positivos para el virus Epstein Barr.

Once de los 14 casos EBV positivos fueron de tipo no GCB (78,57%). En los casos con EBV negativos, se encontraron GCB y no GCB en 54 pacientes (25,0%) y 162 pacientes (75,0%), respectivamente.

En el estudio de Park S et al. (*Park S et al. Blood. 2007*) 34 casos (9%) se identificaron como EBER-positivos (y se clasificaron como EBV+). Estos pacientes mostraron una supervivencia global sustancialmente más baja y supervivencia libre de progresión de 12,8 meses frente a 35,8 meses de los casos EBER (P = 0,018). La positividad del virus Epstein Barr se relacionó con los casos no- GCB.

CD30

CD30 (TNFRSF8) es miembro de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral de las proteínas, codificada por TNFRSF8. Es un antígeno inducido por la activación de un subconjunto de células T normales, linfocitos B y linfocitos infectados con Epstein-Barr (EBV), y es universalmente expresado por las células malignas del linfoma T anaplásico de células grandes (*Stein et al, Blood. 1985*). El Brentuximab-vedotin es un anticuerpo conjugado de fármacos con actividad anti-CD30 y es eficaz en el tratamiento del linfoma de Hodgkin clásico recidivante y del linfoma anaplásico de

células grandes sistémico, recibiendo recientemente aprobación de la US Food and Drug Administration para su uso en estas enfermedades. Los patrones de expresión de CD30 en LBDCG no están bien estudiadas hasta la fecha, pero la aparición de brentuximab-vedotin como alternativa terapéutica en los linfomas que expresan CD30 ha determinado la extensión y la importancia de la expresión de CD30 como un problema clínicamente relevante en LBDCG y en otros cánceres linfoides.

El objetivo del estudio Slack et al. (*Slack, GW et al. BJH, 2014*) fue evaluar la expresión de CD30 y su significación clínica en LBDCG e intentar validar los resultados de Hu et al. (*Hu et al. Blood 2013*) en una cohorte poblacional de pacientes de British Columbia.

El estudio observó que CD30 se expresa en aproximadamente el 25% de los pacientes LBDCG. Además se determinó que el análisis mediante inmunohistoquímica de CD30 puede ser útil como marcador pronóstico en GCB-LBDCG tratados con R-CHOP, ya que está asociado con una tendencia hacia un mejor resultado. La fuerte asociación de CD30 con EBV positivo no-GCB LBDCG sugiere una patobiología distinta para estos casos. Por último, la presencia de expresión de CD30 en una proporción modesta de pacientes con LBDCG justifica la investigación de estrategias terapéuticas novedosas, incluyendo el uso de brentuximab vedotina en combinación con terapias tradicionales de primera línea o como una terapia alternativa en un entorno de recaída o refractario.

CD5

CD5 es una glicoproteína de superficie celular típicamente expresada en células T normales y neoplásicas, así como en un subconjunto de células B y células de linfoma, principalmente en leucemia linfocítica crónica / linfoma linfocítico de células pequeñas (CLL / SLL) y linfoma de células de manto. CD5 tiene un inmunoreceptor de tirosina que inhibe la respuesta de células T y la señalización del receptor de células B.

También se ha encontrado que el CD5 se expresa, aunque rara vez, en el LBDCG. Hasta la fecha, a gran escala los estudios de CD5 + en LBDCG muestran una prevalencia de 5 a 22% de todos LBDCG.

El estudio de Xu-Monette ZY et al. (*Xu-Monette ZY et al. Oncotarget, 2015*) de 879 pacientes con LBDCG identificó 48 (5,5%) pacientes CD5 +, asociadas con mayor frecuencia de ECOG > 1, recaída en el SNC, subtipo ABC, Bcl-2 + y activación de STAT3. Mientras que con menor frecuencia se asocia a CD30 +, SSBP2 +, y mutaciones en MYC. La señalización de CD5 parece reguladora de las subunidades de NF- κ B, activando c-Rel y p65, disminuyendo la activación de p50.

Otras características asociadas con CD5 + LBDCG en este estudio fueron, edad avanzada, síntomas B, IPI, GCET, CD10, FOXP1 y CXCR4 (receptor de quimioquina implicado en la localización de células tumorales en la médula ósea y el ganglio linfático), pero probablemente se debieron al predominio del subtipo ABC de los pacientes CD5 +. En comparación con estudios previos realizados en Japón, los LBDCG con CD5+ en los países occidentales tuvieron una prevalencia más baja, compartieron características comunes como subtipo ABC, sobreexpresión de Bcl-2, compromiso de médula ósea y desarrollo de recurrencia en el SNC, pero carecían de características de predominio femenino, LDH sérico elevado y estadio de enfermedad más alto (características que sí se observaron

en los casos de los estudios japoneses). Estas diferencias se pueden explicar debido a la variación étnica y genética, la heterogeneidad de CD5 + LBDCG, el mayor número de LBDCG CD5 + (n = 109) en la cohorte japonesa y las características específicas de cohorte.

Dianas terapéuticas

Todos estos estudios tienen como finalidad encontrar las diferencias biológicas para la búsqueda de terapias más dirigidas dependiendo de los subtipos de LBDCG debido a que con la terapia estandarizada (R-CHOP) hay un 40 -50% de los pacientes que no remiten. Aunque el tratamiento de la mayoría de los pacientes con LBDCG es similar, ya hemos visto que esta enfermedad es heterogénea a nivel molecular y puede dividirse en subtipos por GEP. Cada uno de estos subtipos tiene mecanismos distintos de activación oncogénica, y las terapias que se dirigen a subtipos individuales y las mutaciones del conductor están en estudio y muestran resultados esperanzadores. Se espera que el progreso continuo en el desarrollo de nuevas estrategias basadas en una mejor comprensión de la biología molecular de LBDCG allanará el camino para un tratamiento más eficaz de esta enfermedad.

El estudio de Wilson et al. (Wilson et al, Nature Medicine. 2015) es un ensayo clínico prospectivo fase I/II que estudia el tratamiento con ibrutinib como terapia alternativa en los LBDCG. En este estudio basado en la hipótesis de que dentro de los tumores LBDCG el subtipo ABC, pero no GCB, responden a ibrutinib, un inhibidor de la señalización BCR.

En la revisión que realizaron Dunleavy K y Wilson WH (*Dunleavy K y Wilson WH, Oncology, 2014*) se estudiaron distintas dianas terapéuticas. Como otro agente que ha mostrado actividad en el subtipo ABC es el fármaco inmunomodulador lenalidomida. En un estudio de fase II de pacientes con LBDCG recidivante y refractario, la tasa de respuesta global fue de 55 % en aquellos con el subtipo ABC frente al 9% en aquellos con el subtipo GCB. Estos resultados sugieren actividad.

La inhibición de la topoisomerasa II con agentes tales como el etopósido (a través de la degradación de la proteína mediada por la ubiquitina, y posiblemente la inhibición de la transcripción) da como resultado una regulación negativa de la expresión de Bcl-6. Esto puede ayudar a explicar la mejora en la supervivencia libre de eventos en pacientes más jóvenes que recibieron etopósido además de CHOP (CHOEP vs CHOP solo). Aunque el beneficio de añadir etopósido se perdió cuando se añadió rituximab a CHOEP (R-CHOEP). Esta relación entre la inhibición de la topoisomerasa II y Bcl-6 sugiere que los regímenes que pueden inhibir más eficazmente la topoisomerasa II pueden ser más eficaces en pacientes con GCB LBDCG, incluso cuando se consideran regímenes que incluyen rituximab. El régimen DA-EPOCH-R incorpora dos inhibidores de la topoisomerasa II, etopósido y doxorubicina (*Dunleavy K y Wilson WH, Oncology, 2014*).

Otro objetivo terapéutico prometedor en GCB LBDCG es EZH2. Mutaciones de ganancia-función en EZH2 resultan del aumento de la metilación de H3K27 y están presentes en el 25% de los pacientes con GCB LBDCG, y los inhibidores de EZH2 son tóxicos para las líneas celulares GCB (*Dunleavy K y Wilson WH, Oncology, 2014*).

Otra alteración potencialmente importante que se expresa tanto en los subtipos GCB como en los ABC es c-MYC. Aproximadamente el 10% de los LBDCG lo alberga y la

mayoría de estos casos son casos tipo GCB. Tener un reordenamiento c-MYC es importante clínicamente porque se ha asociado con una alta proliferación tumoral y peores resultados siguiendo el tratamiento R-CHOP estándar. Esta vía terapéutica todavía está poco explorada.

BCL2 es una diana terapéutica potencialmente importante que se expresa en GCB y ABC LBDCG, aunque a través de diferentes mecanismos. En GCB, la expresión de BCL2 está asociada con t (14:18) en la mayoría de los casos. En el subtipo ABC, la sobreexpresión de BCL2 se asocia con la activación constitutiva de NF-KB. Es probable que BCL2 sea un objetivo terapéutico importante, y varios inhibidores de BCL2, como navitoclax y ABT-199, están en desarrollo (*Dunleavy K y Wilson WH, Oncology, 2014*).

Siguiendo con esta necesidad de buscar nuevas dianas terapéuticas se estudia la expresión CD30 en este tipo de linfomas. (Slack, BJH, 2014).). Un candidato prometedor es el brentuximab vedotin, un conjugado anticuerpo-fármaco dirigido a células que expresan CD30. Utilizando inmunohistoquímica se observó que CD30 se expresa en una proporción sustancial de LBDCG, y que la IHC CD30 puede ser un marcador pronóstico útil para los linfomas tipo GCB en tratamiento con R-CHOP.

Material y métodos

Se llevó a cabo una revisión bibliográfica, un estudio inmunohistoquímico y un estudio estadístico.

Revisión bibliográfica

Se ha realizado una revisión de la literatura en relación con el pronóstico de los LBDCG. Se han seleccionado artículos relacionados con el tema "DLBCL", "inmunohistochemical algorithms", "management of subtypes of DLBCL", "CD30 expression", "PDL1 expression" "CD5 expression" "Double positive" publicados en revistas internacionales en el área de hematología, oncología y anatomía patológica.

Se han revisado 18 artículos originales. Se trata de 14 estudios retrospectivos, 3 prospectivos, una revisión y un meta-análisis. Los artículos se han publicado entre el 2003 y el 2017. Las publicaciones analizadas incluyen publicaciones en el Nature Medicine (2 artículo), Leukemia (2 artículo), Blood (5 artículos), Oncotarget (1 artículo), Oncology (1 artículo), CCR (2 artículos), Journal of Clinical Oncology (3 artículos), Clinical Lymphoma, Myeloma y Leukemia (1 artículo), Cancer Sci (1 artículo).

Muestras tumorales, fabricación del TMA, Inmunohistoquímica

Se recogieron muestras de 55 pacientes diagnosticados de LBDCG. Se obtuvieron biopsias tanto escisional, incisional como biopsia con aguja gruesa. Las muestras se agruparon en TMA (Figura 1). Para la realización del TMA se obtienen 2 muestras de 1mm con 2 agujas. Las muestras llegaron al laboratorio en fresco o en formol, en el laboratorio se fijaron con formol y se incluyó parafina. De cada muestra se hizo un estudio con hematoxilina eosina (HE) e inmunohistoquímica (IHC) con un panel de anticuerpos monoclonales.

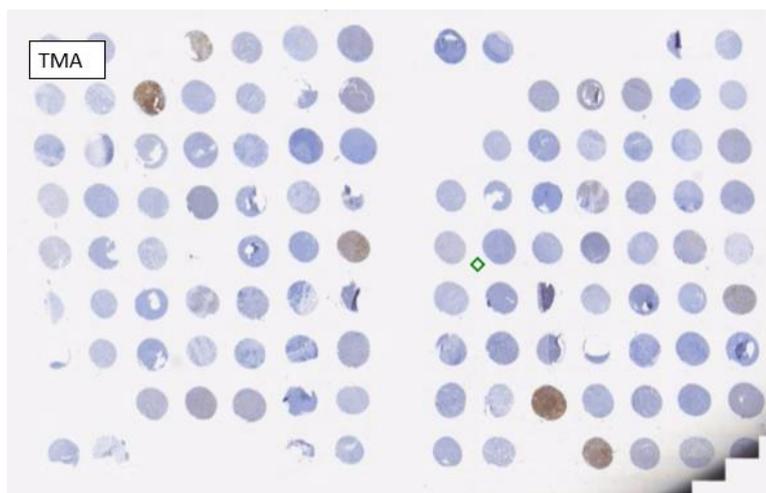


Figura 1: Se muestra un ejemplo de la preparación TMA que se ha utilizado para estudiar los casos con los distintos marcadores. En este caso las muestras se han marcado para p53.

Todos los casos fueron confirmados histológicamente como LBDCG.

Se utilizó un dispositivo de tejido arrayer (Beecher Instruments, Sun Prairie, WI) para construir bloques de microarrays de tejidos (TMA), de acuerdo con los protocolos convencionales. También se analizaron secciones de tejido estándar en algunos casos. Se realizó la tinción inmunohistoquímica de la siguiente manera: se cortaron TMAs de 2 - 4 μm de grosor incrustados en parafina en portaobjetos Dako (Dako, Agilent Technologies, California, EE.UU.), y posteriormente se desparafinaron, se rehidrataron y se sometieron a recuperación de antígeno calentando en Tris 50 mM (Trizma base) -1 mM EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) (Sigma Chemicals, St. Louis, EE.UU.) (pH 8) o citrato 10 mM pH 6,5 en un sistema automático. Los portaobjetos se enfriaron y se trataron con solución bloqueadora de peroxidasa (Dako) durante 5 min.

Las secciones se marcaron con anticuerpos monoclonales contra los siguientes antígenos: CD20, CD3, BCL2, CD10, BCL6, CD30, LMP1, EBER, Ki67, p53, c-Myc, CD5, MUM1, PD1, PDL-1, y PD1. Contra-teñidos con hematoxilina. Se usaron incubaciones, con el anticuerpo específico. *Tabla 1.*

Para determinar si los casos eran Epstein Barr positivos se utilizaron los marcadores LMP-1 y EBER. Para el marcador EBER se utilizó una técnica de hibridación in situ cromogénica (CISH). EBER es un marcador nuclear (identifica RNAs de EBV), mientras que LMP 1 es un marcador de membrana (identifica la proteína latente de membrana 1 de EBV). La marcación de EBER se realiza a través de una sonda que se une a la secuencia de RNA, localizada en el núcleo y a la que se le une un anticuerpo marcado. LMP 1 se marca con un anticuerpo que se sitúa en la membrana y secundariamente se une un nuevo anticuerpo marcado.

Antígeno	Anticuerpo monoclonal
CD20	L26
EBV- LMP	LMP-1
P53	DO-7
BCL2	124
CD10	56C6
BCL6	PG-B6p
MUM1	MUM1p
CD30	BerH2
CD5	4C7
Ki67	SP6
EBER	EBERs CISH
C-Myc	EP121
PD1	NAT105
PDL-1	22C3

Tabla 1: Se muestra el anticuerpo monoclonal que se ha utilizado para marcar cada antígeno.

Evaluación de la tinción IHC y análisis estadístico.

Se determinó la positividad de los casos para los diferentes marcadores según los puntos de corte descritos en la literatura.

Para los marcadores CD10, BCL6 y MUM1 se consideró positivo cuando se tiñeron más o igual al 30% de las células (*Hans et al Blood, 2004*). El marcador Bcl2 se consideró positivos cuando se tiñeron más del 50% de las células. Para considerar las muestras c-Myc positiva se tomó como punto de corte un 40% (*Green et al, JCO 2012*). Para PDL-1 se tomó como punto de corte un 30% (*Kiyasu et al., Blood, 2015*). Para LMP1 y EBER un 20%. En los marcadores CD30 y p53 los puntos de corte más estandarizados son 30% (*Hu et al. Blood 2013*) y 50% (*Xu-Monette ZY. et al. Blood. 2017*), respectivamente. No obstante se estudió la prevalencia tomando distintos puntos de corte. El punto de corte para CD5 no está aún bien definido en la literatura, pero cuando un caso LBDCG es positivo para CD5 la mayoría de las células son marcadas.

Se calculó el porcentaje de casos positivos para cada marcador. Se clasificaron los casos en GCB y no GCB según el algoritmo de Hans (*Hans et al. Blood. 2004*). Se clasificaron en doble positivos según la positividad para c-Myc y BCL-2. Se determinó la media, mediana, desviación estándar, rango, máximo y mínimo para los marcadores p53, Ki67, PD1 en LR.

Se ha estudiado la relación de los distintos de marcadores con la clasificación de los casos en GCB y no-GCB según el algoritmo de Hans mediante tablas de contingencia y pruebas de Chi cuadrado.

Se ha utilizado el software Office Excel, 2010 y el software estadístico SPSS v16.

Resultados

Se confirmó el diagnóstico de LBDCG con las técnicas de HE e IHC para CD20 en 53 casos (Figura 2). De los 55 casos hay un caso negativo y uno no valorable para CD20, por lo que en el análisis estadístico se tiene en cuenta 53 casos. De los 53 casos todos son positivos al 100% para CD20 excepto un caso, con una positividad del 60%.

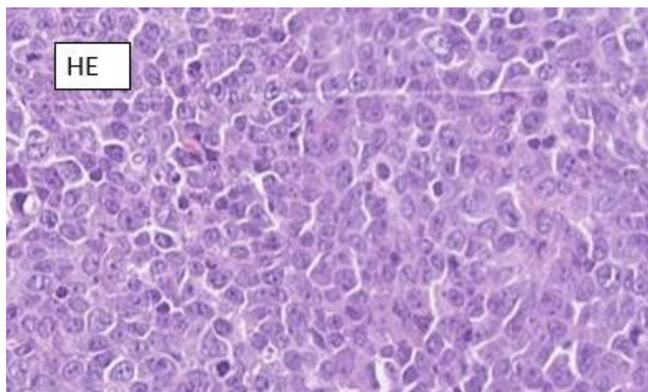


Figura 2: un ejemplo de un caso LBDCG teñido con Hematoxilina-eosina.

Para determinar el subtipo de estos casos entre GCB y no-GCB LBDCG se utilizó el algoritmo de Hans. Dieciocho casos fueron positivos para CD10 y uno fue no valorable. BCL6 fue positivo en 38 muestras. MUM1 fue positivo en 10 muestras. 33 casos (62,3%) fueron clasificados en subtipo GCB LBDCG, y 20 (37,7%) en subtipo no GCB LBDCG. Figuras 3 y 4.

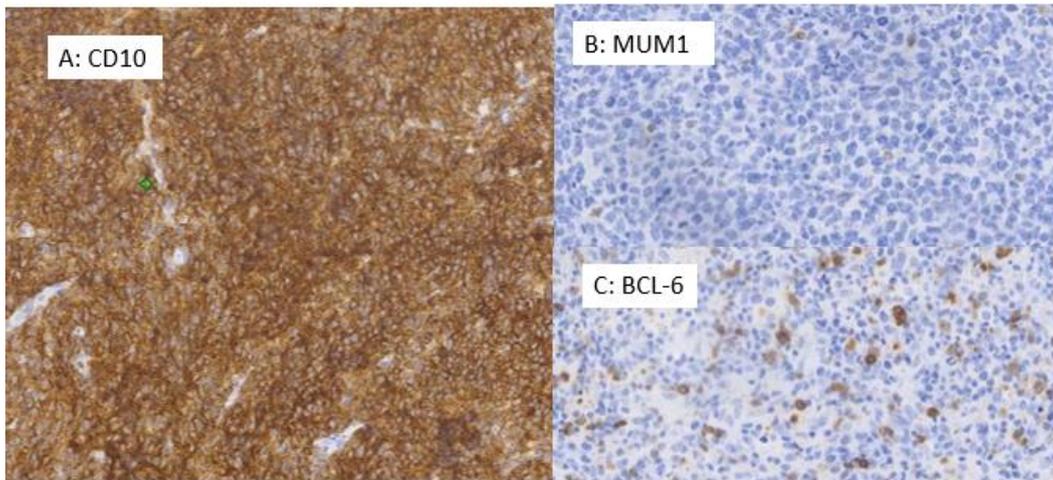


Figura 3. Se muestran 3 imágenes de IHC de un caso GCB. Se observa tinción positiva para CD10 (A). Y tinción negativa para MUM1 (B) y Bcl-6 (C).

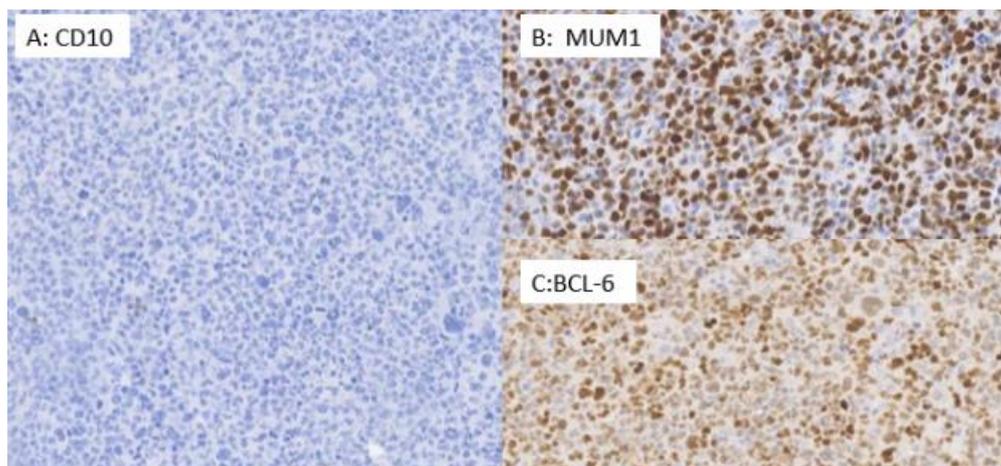


Figura 4: Se muestran 3 imágenes de IHC de un caso no-GCB. Se observa la tinción negativa de CD10 (A). L tinción positiva de MUM1 (B) y Bcl-6 (C)

Se estudiaron los linfomas doble positivos, es decir, positivos para Myc y Bcl-2 (figura 5). Es nuestra muestra 13 casos son Myc + y 19 Bcl2 +. De ellos 8 son positivos para ambos (doble positivo), un 15,1% de la muestra. De los linfomas doble positivos tres casos corresponden con linfomas del subtipo de GCB y cinco con linfomas del subtipo no GCB (según el algoritmo de Hans). Se estudió la correlación de los casos DP con el subtipo no-GCB, se aplicó el estudio Chi- Cuadrado por el cual asociar el doble positivo con el subtipo GCB o no-GCB no es estadísticamente significativo en nuestra muestra puesto que tiene un error del 0,819, ($p > 0.05$). Por lo tanto, en esta muestra no podemos asociar los linfomas doble positivo con el subtipo GCB o no- GCB. Tabla 2 y 3.

Tabla cruzada GCB*DP

			DP		Total
			DP	NO	
GCB	GCB	Recuento	5	30	35
		% dentro de DP	62,5%	66,7%	66,0%
NO GCB		Recuento	3	15	18
		% dentro de DP	37,5%	33,3%	34,0%
Total		Recuento	8	45	53
		% dentro de DP	100,0%	100,0%	100,0%

Tabla 2. Tabla de contingencia. Casos GCB y non- GCB comparando con los casos Doble positivo.

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Significación asintótica (bilateral)	Significación exacta (bilateral)	Significación exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	,053 ^a	1	,819		
Corrección de continuidad ^b	,000	1	1,000		
Razón de verosimilitud	,052	1	,820		
Prueba exacta de Fisher				1,000	,557
N de casos válidos	53				

a. 1 casillas (25,0%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es 2,72.

b. Sólo se ha calculado para una tabla 2x2

Tabla 3. Resultados estudio Chi-cuadrado de la tabla 2.

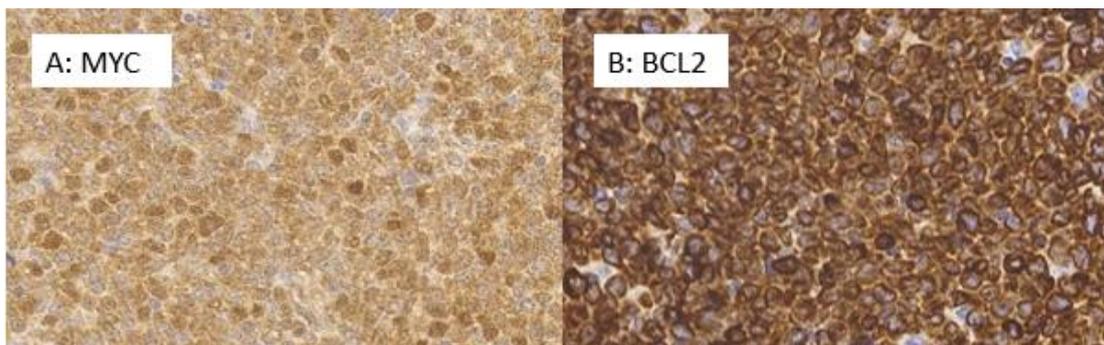


Figura 5. Ejemplo de un caso doble positivo. Se observa que más del 40% de las células están teñidas en el estudio de MYC (A); y que más del 50% están teñidas en el estudio de BCL2 (B).

Para ver la concordancia entre los linfomas y el virus del Epstein Barr se estudió la positividad de LMP1 y EBER. Solo un caso resulto positivo (2% de la muestra). Este caso correspondía al subtipo no GCB LBDCG.

La positividad de CD30 se observó en 5 casos, tomando como punto de corte un 20%. De los cuales 2 corresponden con subtipos GCB, y 3 con no-GCB LBDCG. El caso que es positivo para Virus del Epstein Barr es negativo para CD30.

Puesto que el punto de corte para el marcador CD30 no está bien establecido en la literatura, y se ha observado que con una mínima expresión de CD30 los linfomas responden a la terapia anti- CD30, se ha estudiado la positividad tomando otros puntos de corte. Si tomamos un 10% como punto de corte, 8 casos son positivos (15,09%). Si tomamos como punto de corte de 5%, 9 casos son positivos (16,98%).

Se estudiaron también los valores para el marcador tumoral Ki67 y la proteína p53 en inmunohistoquímica. En cuatro casos no se observó expresión de la proteína Ki67. La media de expresión de Ki67 fue de 54,687, con una desviación estándar de 27,71, y un rango de máximo 90% y mínimo 0%. La ausencia de expresión de la proteína puede estar relacionada con artefactos relacionados con la fase preanalítica (fijación en formol).

La proteína supresora de tumores, p53, fue positiva en tres casos (5,66%), tomando como punto de corte 50%. Con una media de expresión de 12,54%, con una desviación estándar de 20,182 y un rango de máximo 90% y mínimo 0%. De los tres casos positivos para p53, uno corresponde a no GCB LBDCG y los otros dos a GCB LBDCG.

El punto de corte de p53 no está bien definido en la literatura. Si se toma un 30% como punto de corte 10 casos son positivos para p53 (18,87%). Con un punto de corte del 10%, 24 casos son positivos (42,28%). Y con un punto de corte del 5%, 27 casos son positivos (50,94%).

Se estudiaron también los casos PDL-1 + (ligando de muerte celular programada 1)

(figura 6). Teniendo en cuenta un punto de corte de 30%, seis casos fueron positivos (11,3%). De ellos cinco casos correspondían con subtipo GCB LBDCG, y 1 con non-GCB LBDCG. Tabla 4 y 5.

También se estudió el PD1 tanto en células tumorales como en linfocitos reactivos. El PD1 resulto positivo en 6 casos de los cuales uno era positivo para PDL-1. En los linfocitos reactivos (LR) PD1 tiene una media de expresión de 11,35 con una desviación estándar de 13,901.

En la relación entre los casos positivos para PDL 1 y PD1 en LR se observó que en 4 de los 6 casos positivos para PDL1 son negativos para PD1 en LR. Los otros dos uno tiene un 25% positivo en LR y el otro un 5%.

Tabla cruzada SUBTIPO*PDL

			PDL		Total
			NO	PDL-1	
SUBTIPO	GCB	Recuento	30	5	35
		% dentro de PDL	63,8%	83,3%	66,0%
	NO GCB	Recuento	17	1	18
		% dentro de PDL	36,2%	16,7%	34,0%
Total		Recuento	47	6	53
		% dentro de PDL	100,0%	100,0%	100,0%

Tabla 4. Tabla de contingencia para observar la relación entre la positividad de PDL-1 y los subtipos de LBDCG, GCB y no GCB.

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	Gl	Significación asintótica (bilateral)	Significación exacta (bilateral)	Significación exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	,902 ^a	1	,342		
Corrección de continuidad ^b	,242	1	,623		
Razón de verosimilitud	1,004	1	,316		
Prueba exacta de Fisher				,651	,325
N de casos válidos	53				

Tabla 5. Resultado del estudio Chi-cuadrado de la tabla 4.

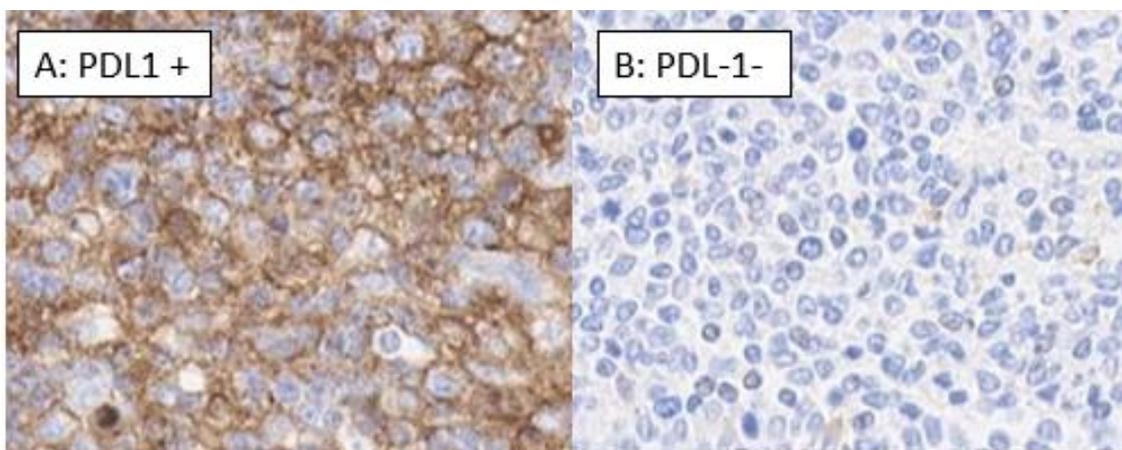


Figura 6: En la primera imagen se observa un caso positivo para PDL-1 (A). En la segunda imagen se observa un caso negativo para PDL-1 (B).

CD5 fue positivo en 2 casos con un 60% y 90%. Otro caso tuvo una positividad del 10%. Todos los casos correspondieron con linfomas GCB (según algoritmo de Hans). (Figura 7)

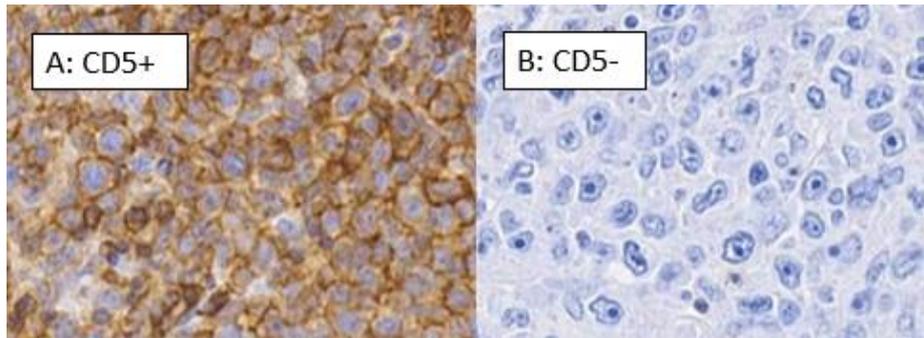


Figura 7. En la primera imagen se muestra un caso LBDCG con marcación positiva para CD5 (A). A la derecha se muestra un caso LBDCG con marcación negativa para CD5.

Marcador	Número de casos positivos/total de casos	Porcentaje %
CD20	53/53	100%
CD10	18/53	33,96%
BCL6	38/53	71,7%
MUM1	10/53	18,87%
GCB	33/53	62,3%
Non-GCB	20/53	37,7%
c-Myc	13/53	24,53%
BCL2	19/53	35,85%
DP	8/53	15,1%
EBV- LMP1+ y EBER	1/53	2%
Ki67	50/53	94,34%
P53	9/53	16,98%
PDL-1	6/53	11,3%
PD1	6/53	11,32%
CD5	2/53	3,77%
CD30	5/53	9,43%

Tabla 6. Resumen de los resultados de los casos resultados para diferentes marcadores en las muestras inmunohistoquímica.

Discusión

GCB/no-GCB

En este estudio se clasificaron los 53 casos de LBDCG en subtipos GCB y no- GCB según el algoritmo de Hans. Esto dio como resultado que siguiendo el algoritmo de Hans 33 casos (62,3%) fueron clasificados en subtipo GCB LBDCG, y 20 (37,7%) en subtipo no GCB LBDCG. En el estudio de Hans en una muestra de 152 pacientes un 42% correspondían a casos GCB y un 58% a casos no- GCB. Se ve claramente una diferencia en el porcentaje, siendo más comunes los casos GCB en nuestro estudio frente a los no-GCB al contrario que en el estudio de Hans.

La importancia de realizar esta división entre los dos subtipos de linfomas radica en la diferencia pronóstica de cada subtipo, y la búsqueda de nuevas terapias terapéuticas dirigidas a cada subtipo.

Doble positivo

Se determinaron doble positivo (DP) a aquellos casos en los que había un aumento de la expresión de los marcadores Myc y Bcl2, con una expresión del 40% y 50% respectivamente. Se observó que un 15,1% de los casos fueron doble positivos. Comparando este dato con la literatura observamos que es un porcentaje menor del que se viene describiendo. En estudios como Green et al, Johnson et al o Hu et al, describen un porcentaje de doble positivos de 29%, 21% y 34%, respectivamente. Es cierto que en estos estudios se estudiaron un número mayor de pacientes (193, 167 y 700 respectivamente).

En nuestra muestra de los 8 casos doble positivos 5 casos (62,5%) corresponden a casos GCB, y 3 (37,5%) corresponden a casos no-GCB. La asociación de los casos DP y GCB no es estadísticamente significativa ($P > 0,05$). Comparando con la literatura, en el estudio de Hu et al. (Hu et al. *Blood* 2013) se observó que un 66% de los casos DP correspondían con casos no-GCB.

Una posible explicación a la discrepancia en la prevalencia de casos DP podría estar en el número relativamente bajo de casos con el fenotipo no-GCB en nuestra serie, en comparación con las series publicadas en la literatura.

CD30

Se ha observado que la positividad de CD30 en linfomas Epstein Barr negativos se ha asociado con un mejor pronóstico. En nuestra muestra si tomamos como punto de corte el 20% hay 5 casos que son positivos para CD30 (9,43%). Todos los casos CD30 positivos son negativos para el virus del Epstein Barr. Sin embargo, puesto que la terapia anti-CD30 tiene actividad ante una mínima expresión de CD30 es interesante observar el número de casos positivos con números de corte menores. Si tomamos un 10% como punto de corte, 8 casos son positivos (15,09%). Si tomamos como punto de corte de 5%, 9 casos son positivos (16,98%). Por lo tanto 9 casos podrían beneficiarse de la terapia con brentuximab vedotina.

Virus Epstein-Barr

En nuestra muestra un único caso (2%) fue positivo para el virus del Epstein Barr. Comparando con lo descrito en la literatura en países occidentales el porcentaje de LBDCG positivos es menor del 5%. En nuestra muestra el caso positivo también es una caso no-GCB. Este dato (el fenotipo no-GCB del caso EBV+) coincide con lo publicado en series retrospectivas de casos de LBDCG EBV positivo, en los que se da un mayor porcentaje de casos con este fenotipo.

P53

La mutación TP53 es un marcador independiente de mal pronóstico en pacientes con Linfoma de células B grandes (LBDCG).

En el estudio de Xu-Monette ZY et al. (*Xu-Monette ZY. et al. Blood. 2017*) un 21,9% de los casos tenían una mutación de p53. En nuestra muestra solo un 5,66% de los casos fueron positivos para p53 (tomando como punto de corte el 50%). En nuestra muestra 2 de los casos que muestran una posible mutación de p53 son GCB. En el estudio de Xu-Monette se observó el valor predictivo de las mutaciones de TP53 se limitó a los pacientes con GCB- LBDCG.

PDL-1

Se ha estudiado en nuestra muestra la presencia de PDL-1+ y PD-1+ en las células tumorales y la presencia de PD-1 en linfocitos reactivos.

Este aumento de expresión de PDL-1 puede estar explicado por varios mecanismos. En el estudio de Kiyasu (*Kiyasu et al., Blood, 2015*) se ha encontrado una asociación significativa entre la expresión de PD-L1 y la ganancia del cromosoma 9, donde se encuentra el gen PD-L1.

Por otro lado Las células que expresan PD-L1 tienen diversos mecanismos para evadir la inmunidad de las células T. Uno de los mecanismos más importantes es la inducción de apoptosis en células T específicas de antígeno asociadas a tumor PD-1 + a través de la vía PD-1 / PD-L1.

PD-L1 + LBDCG también se asocia significativamente con la infección por EBV. La infección de EBV es un mecanismo alternativo para la inducción de PD-L1 en linfomas de Hodgkin.

En nuestra muestra seis casos fueron positivos (11,3%) para PDL-1. De ellos 5 casos correspondían con subtipo GCB LBDCG (83,3%), y dos con non-GCB LBDCG (16,7%). En la literatura hay estudios en los que el 75% de los casos son PDL-1+ (*Rossille D et al. Leukemia. 2014*) y otros en los que son positivos el 11% (*Chen BJ et al Clin Cancer Res. 2013*). Por lo tanto la proporción de LBDCG PDL1+ no está aún bien establecida en la literatura. En diferentes estudios sí que se observó un mayor número de casos PDL-1+ dentro del subtipo no-GCB. Sin embargo en nuestra muestra se observó un mayor

número de casos positivos para PDL-1 dentro del subtipo GCB. Se estudió con una tabla de contingencia y un estudio Chi- cuadrado para ver si esta relación era estadísticamente significativa. El resultado fue no estadísticamente significativa con una $P > 0,05$ ($P = 0,347$). Tabla 5 y 6.

PD-1 se expresa en los linfocitos infiltrantes de tumores (TILs o LR), y la presencia de un gran número de PD-1 + en TILs se asocia con supervivencia global favorable (OS) en pacientes con LBDCG (*Kiyasu et al., Blood, 2015*). Los casos con PD-1 + en TILs se asociaron con el subtipo GCB.

En nuestra muestra 33 casos (63,46%) mostraron PD-1 + en LR o TILs con una expresión de al menos 5% (siendo un caso no valorable). De los cuales 21 casos (63,64%) correspondían a GCB LBDCG, y 12 casos (36,36%) con no-GCB.

El PD1 en células tumorales resulto positivo en 6 casos de los cuales uno era positivo para PDL-1.

Puesto que los casos PDL-1 + no fueron Epstein Barr +, y solo un caso presenta positividad de PD-1 y de PDL-1, tendríamos que pensar que la causa de la sobreexpresión de PDL-1 en la mayoría de los casos puede estar relacionada con alteraciones genéticas en el cromosoma 9. Para confirmarlo sería necesario un estudio citogenético/FISH para la detección de amplificaciones en 9p24.

CD5

CD5 en los LBDCG ha sido estudiado sobre todo en países como Japón donde la expresión de CD5 se estima entre el 5-22% de los LBDCG. En los países occidentales este marcador esta menos estudiados pero en estudios como el de Xu-Monette (*Xu-Monette ZY et al. Oncotarget, 2015*) se estima que un 5% de los LBDCG son CD5+. La positividad de CD5 se ha observado más comúnmente en el subtipo no-GCB. Además CD5+ se asoció con Bcl-2.

En nuestra muestra CD5 fue positivo en 2 casos (3,77%) con un 60% y 90%. Otro caso tuvo una positividad del 10%. Todos los casos correspondieron con linfomas GCB. Como solo dos casos fueron positivos no tenemos una muestra lo suficientemente grande para poder comparar estos casos con los de otros estudios con una n superior.

Uno de los casos mostraba positividad para Bcl-2 en un 90% de las células, y el otro en el 60%.

Conclusión

La inmunohistoquímica en tejido procedente de biopsias es una técnica factible para el fenotipado de los casos de LBDCG.

La inmunohistoquímica nos permite dividir los pacientes con LBDCG en dos grandes grupos, casos GCB y no-GCB. Puesto que los casos no-GCB se asocian a una menor supervivencia con el tratamiento R-CHOP, estos casos podrían beneficiarse de nuevas

terapias. Un ejemplo de estas terapias sería el ibrutinib, o lenalidomida. En el caso de la lenalidomida se ha demostrado una acción efectiva en el 55% de los casos ABC que habían sido refractarios y recidivantes. La tasa de respuesta a ibrutinib fue del 55,5% entre los casos ABC. Por lo tanto, sí que parece indicado el estudio inmunohistoquímico de los casos LBDCG refractarios y recidivantes, para la búsqueda de aquellos casos no-GCB que podrían beneficiarse de estas nuevas terapias, en el contexto de ensayos clínicos.

Otros marcadores identifican subgrupos de menor proporción de pacientes. Un ejemplo es la positividad para Bcl-2 y Myc. Tener un reordenamiento c-MYC se ha asociado con una alta proliferación tumoral y peores resultados con tratamiento R-CHOP, incluso en los casos GCB, que se asocian con mejor pronóstico. Sin embargo solo un 10% de los casos LBDCG presentan este reordenamiento. Esta vía terapéutica todavía está poco explorada.

Es probable que BCL2 sea un objetivo terapéutico importante, y varios inhibidores de BCL2, como navitoclax y ABT-199, están en desarrollo. Si esta vía terapéutica se desarrolla con buenos resultados, sí que sería de utilidad el estudio inmunohistoquímico para c-Myc y Bcl-2 en los casos LBDCG refractarios a la terapia R-CHOP.

El CD30+ puede observarse en torno al 25% de los casos LBDCG. La terapia anti-CD30 con brentuximab vedotina ha dado resultados satisfactorios en otros tipos de linfomas. Por ello es interesante el estudio inmunohistoquímico de este marcador para poder identificar a los pacientes que se pueden beneficiar de terapias con brentuximab vedotina en combinación con terapias tradicionales de primera línea o como una terapia alternativa en casos de recaída o refractarios.

Por lo tanto, parece de utilidad el estudio inmunohistoquímico en la práctica diaria de los casos LBDCG, en busca de marcadores biológicos con poder pronóstico o posibles dianas terapéuticas. Parece especialmente importante en aquellos casos refractarios a la terapia estándar con R-CHOP, buscando subtipos biológicos que puedan beneficiarse de nuevas terapias.

Bibliografía

1. Hans C, Weisenburger D, Greiner T, Gascoyne R, et al. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood*. 2004; 103(1): 275-282
2. Choi W, Weisenburger D, Greiner T, et al. A new immunostain algorithm classifies diffuse large B-Cell lymphoma into molecular subtypes with high accuracy. *CCR*. 2009; 15(17): 5494-5502
3. Visco C, Li Y, Xu-Monette ZY, et al. Comprehensive gene expression profiling and immunohistochemical studies support application of immunophenotypic algorithm for molecular subtype classification in diffuse large B-cell lymphoma: A report from the International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program Study. *Leukemia*. 2012; 26(9):2103-2113.
4. Meyer PN, Fu K, Greiner TC, et al. Immunohistochemical methods for predicting cell of origin and survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab. *J Clin Oncol*. 2011;29:200–207
5. Gutiérrez-García G, Cardesa-Salzmán T, Climent F, et al. Gene-expression profiling and not immunophenotypic algorithms predicts prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with immunochemotherapy. *Blood* 2011; 117: 4836–4843.
6. Batlle-López A, de Villambrosía SG, Francisco M, et al. Stratifying diffuse large B-cell lymphoma patients treated with chemoimmunotherapy: GCB/non-GCB by immunohistochemistry is still a robust and feasible marker. *Oncotarget*. 2016;7(14):18036-18049
7. Read JA, Koff JL, Nastoupil LJ, et al. Evaluating cell-of-origin subtype methods for predicting diffuse large B-cell lymphoma survival: A meta-analysis of gene expression profiling and immunohistochemistry algorithms. *Clinical lymphoma, myeloma & leukemia*. 2014;14(6):460-467
8. Green TM, Young KH, Visco C, et al. Immunohistochemical Double-Hit Score Is a Strong Predictor of Outcome in Patients with Diffuse Large B-Cell Lymphoma

Treated With Rituximab Plus Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine, and Prednisone. *Journal of Clinical Oncology*. 2012; 20 (28): 3460-3467

9. Johnson NA, Slack GW, Savage KJ, et al. Concurrent Expression of MYC and BCL2 in Diffuse Large B-Cell Lymphoma Treated With Rituximab Plus Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine, and Prednisone. *Journal of Clinical Oncology*. 2012;30(28):3452-3459
10. Hu S, Xu-Monette ZY, Balasubramanyam A, et al. CD30 expression defines a novel subgroup of diffuse large B-cell lymphoma with favorable prognosis and distinct gene expression signature: a report from the International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program Study. *Blood*. 2013;121(14):2715-2724
11. Kiyasu J, Miyoshi H, Hirata A, et al. Expression of programmed cell death ligand 1 is associated with poor overall survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 2015;126(19):2193-2201
12. Sato A, Nakamura N, Kojima M, et al. Clinical outcome of Epstein-Barr virus-positive diffuse large B-cell lymphoma of the elderly in the rituximab era. *Cancer Sci*. 2014;105:1170–1175
13. Stein H, Mason DY, Gerdes J, et al. The expression of the Hodgkin disease associated antigen Ki-1 in reactive and neoplastic lymphoid tissue: evidence that Reed-Sternberg cells and histiocytic malignancies are derived from activated lymphoid cells. *Blood*. 1985;66:848
14. Park S, Lee J, Ko YH, et al. The impact of Epstein-Barr virus status on clinical outcome in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 2007;110:972–978
15. Wilson W, Young R, Schmitz R, et al. Targeting B cell receptor signaling with ibrutinib in diffuse large B cell lymphoma. *Nature Medicine*. 2015; 21(8):922-926.
16. Dunleavy K, Wilson WH. Appropriate management of molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma. *Oncology (Williston Park)*. 2014;28:326-34.

17. Rossille D, Gressier M, Damotte D, et al. High level of soluble programmed cell death ligand 1 in blood impacts overall survival in aggressive diffuse large B-Cell lymphoma: results from a French multicenter clinical trial. *Leukemia*. 2014;28(12):2367-2375.

18. Chen BJ, Chapuy B, Ouyang J, et al. PD-L1 expression is characteristic of a subset of aggressive B-cell lymphomas and virus associated malignancies. *Clin Cancer Res*. 2013;19(13):3462-3473