



FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

GRADO EN MEDICINA

TRABAJO FIN DE GRADO

DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE LINFOMAS B NO-HODGKIN AGRESIVO. ESTADO DEL ARTE.

Molecular diagnosis of aggressive B-cell
Non-Hodgkin Lymphomas. State of the
art.

Autor: Dña. Ana Manzano Donoso

Director: Dr. Santiago Montes Moreno

Santander, junio 2018

ÍNDICE

Resumen.....	3
Abstract.....	4
Introducción.....	5
Material y métodos.....	9
Resultados.....	11
Discusión.....	16
Conclusión.....	19
Bibliografía.....	20

RESUMEN

Introducción

El linfoma B difuso de célula grande es una entidad muy prevalente dentro de los linfomas no-Hodgkin, con una gran variabilidad clínica. Nuestro objetivo en este trabajo ha sido identificar marcadores biológicos que puedan aportar información diagnóstica y pronóstica en una cohorte de 107 casos, mediante técnicas de inmunohistoquímica, FISH y molecular.

Material y métodos

Se ha realizado revisión histológica, inmunohistoquímica, FISH y estudio molecular de 107 muestras obtenidas por biopsia y revisión bibliográfica de 10 artículos originales y 2 generales para después poder hacer un análisis estadístico descriptivo.

Resultados

Tipo de muestra: 44 muestras se obtuvieron mediante biopsia por trucut, 42 por biopsia escisional y 20 por biopsia incisional, lo que corresponde con un 41,12 %, 39,25 % y un 18,69 % respectivamente.

Fenotipo GCB/no-GCB: un 65,63 % de las muestras analizadas se corresponden con un LBDCG de fenotipo GCB, mientras que el otro 34,38 % son de tipo no-GCB.

Doble positivo: considerando positivo una expresión de MYC de más del 40 % y de BCL2 de más del 50 %, encontramos que 50 de 94 muestras son doble positivo frente a 44 que no lo son (53,19 % y 46,81 %).

CD30: hemos encontrado positividad de CD30 en un 47,42 % de las muestras estudiadas mediante inmunohistoquímica, 46 de 97 biopsias.

Doble hit: en nuestra cohorte de casos hemos encontrado 7 muestras que han sido diagnosticadas como doble hit mediante técnica FISH. Estas son un 8,64 % de un total de 81 muestras.

MYD88: pudimos llevar a cabo estudios moleculares en 63 muestras, en las cuales encontramos 3 con la mutación MYD88L265P (4,76 %). El resto eran casos *wild type*.

Discusión

Nos hemos encontrado con algunas limitaciones a la hora de establecer los resultados analíticos, debido a la falta de muestra que supone la biopsia por trucut, cuyo uso es necesario limitar o, al menos, protocolizar para conseguir información completa del caso.

Aunque la inmunohistoquímica es una técnica válida y muy fiable para una primera aproximación diagnóstica y pronóstica, es necesario completar el resultado mediante FISH, con el fin de identificar los linfomas B de alto grado doble y triple hit.

Palabras clave: Linfoma B difuso de célula grande, GCB, no-BCG, doble hit, doble positivo, FISH, MYD88.

ABSTRACT

Introduction

Diffuse large-cell B lymphoma is a very prevalent entity within non-Hodgkin's lymphomas, with great clinical variability. Our objective in this work has been to identify biological markers that can provide diagnostic and prognostic information in a cohort of 107 cases, using immunohistochemistry, FISH and molecular techniques.

Material and methods

Histological review, immunohistochemistry, FISH and molecular study of 107 samples obtained by biopsy and bibliographic review of 10 original articles and 2 general articles were carried out to later make a descriptive statistical analysis.

Results

Type of sample: 44 samples were obtained by trucut biopsy, 42 by excisional biopsy and 20 by incisional biopsy, which corresponds to 41.12%, 39.25% and 18.69% respectively.

GCB/non-GCB phenotype: 65.63% of the analyzed samples correspond to an LBDCG of GCB phenotype, while the other 34.38% are of non-GCB type.

Double positive: considering positive an expression of MYC of more than 40% and of BCL2 of more than 50%, we found that 50 of 94 samples are double positive versus 44 that are not (53.19% and 46.81%).

CD30: We found positive CD30 in 47.42% of the samples studied by immunohistochemistry, 46 of 97 biopsies.

Double hit: in our case cohort we found 7 samples that have been diagnosed as a double hit using the FISH technique. These are 8.64% of a total of 81 samples.

MYD88: we were able to carry out molecular studies in 63 samples, in which we found 3 with the mutation MYD88L265P (4.76%). The rest were wild type cases.

Discussion

We have encountered some limitations when establishing the analytical results, due to the lack of a sample that involves the trucut biopsy, whose use is necessary to limit or, at least, protocolize to obtain complete information of the case.

Although immunohistochemistry is a valid and very reliable technique for a first diagnostic and prognostic approach it is necessary to complete the result using FISH, in order to identify high-grade double and triple-hit B lymphomas.

Key words: Large cell diffuse B-cell lymphoma, GCB, non-BCG, double hit, double positive, FISH, MYD88.

INTRODUCCIÓN

El linfoma B difuso de célula grande (LBDCG) es el subtipo histológico más común del linfoma no Hodgkin (LNH) B y representa aproximadamente el 25% de los casos de LNH en adultos.

La patogénia molecular de LBDCG es un proceso complejo de etapas múltiples que finalmente da como resultado la transformación y expansión de un clon maligno de origen de células B germinal o post-germinal. Si bien se han dilucidado algunos pasos en esta vía, muchos siguen siendo desconocidos. Los eventos oncogénicos mejor caracterizados son lesiones genéticas adquiridas (p. Ej., reordenamientos de BCL6, BCL2 y MYC), muchos de los cuales también se observan en otras variantes de LNH.

La presentación clínica del LNH varía enormemente según el tipo de linfoma y las áreas de afectación. Algunos se comportan de manera indolente y la linfadenopatía aumenta y disminuye a lo largo de los años. Otros son muy agresivos, lo que provoca la muerte en cuestión de semanas si no se tratan.

Por lo general, los linfomas agresivos comúnmente se presentan de forma aguda o subaguda con una masa de rápido crecimiento, síntomas B sistémicos (fiebre, sudores nocturnos, pérdida de peso, etc.) y/o niveles elevados de lactato deshidrogenasa sérica y ácido úrico. Algunos ejemplos de esta presentación agresiva incluyen linfoma B difuso de célula grande, linfoma de Burkitt, leucemia/linfoma de células T adultas y leucemia/linfoma linfoblástico precursor B y T.

Los linfomas indolentes a menudo son insidiosos y solo presentan linfadenopatías, hepatomegalia, esplenomegalia o citopenias de crecimiento lento. Los linfomas que típicamente tienen estas presentaciones incluyen linfoma folicular, leucemia linfocítica crónica/linfoma linfocítico pequeño y linfoma de la zona marginal esplénica.

Los pacientes con LBDCG son evaluados según el Índice Pronóstico Internacional (IPI). Este índice tiene en cuenta la edad, el estadiaje, la puntuación de en la escala ECOG (forma práctica de medir la calidad de vida de los pacientes oncológicos), los niveles de lactato deshidrogenasa (LDH) y la cantidad de metástasis extranodales. Según la cantidad de factores de riesgo se estratifica al paciente; a mayor número de factores adversos, menos probable es la supervivencia global a cinco años. Por otro lado, aunque se ha demostrado la utilidad de esta herramienta, debemos buscar otras que completen el estudio en función de los nuevos patrones biológicos descubiertos (1,2).

Estudios de células de origen

El perfil de expresión génica (PEG) mediante microarrays a partir de ADNc es el *gold standard* para determinar la célula de origen, pero generalmente se ha realizado con ARN obtenido de tejidos congelados/frescos y no está disponible rutinariamente en la práctica. Dada su facilidad de uso, los algoritmos de inmunohistoquímica son el método más comúnmente utilizado; la concordancia con PEG es aproximadamente del 80%. Aunque aún no está ampliamente disponible, se puede realizar una prueba de expresión genética en tejido embebido en parafina fijado con formalina (basado en PCR cuantitativa digital), que es altamente concordante (alrededor del 95%) con PEG convencional. Cuando está disponible tiene el potencial de reemplazar los algoritmos de inmunohistoquímica para la asignación de células de origen en LBDCG.

El LBDCG es un grupo heterogéneo de tumores que son diversos en términos de su patogénesis molecular subyacente y su resultado clínico. Una cantidad de estudios han subclasificado LBDCG basado en PEG, el sistema más utilizado los separa en dos grupos principales:

- Tipo de células B del centro germinal (GCB): el PEG que se asemeja a una célula B del centro germinal normal. Los tumores GCB demuestran translocaciones t(14;18) en aproximadamente 30 a 40% de los casos y tienen una tasa superior de supervivencia a cinco años con la terapia R-CHOP estándar.
- Tipo de célula B activada (ABC): estos casos tienen un PEG que se asemeja a una célula B activada. Es probable que estos tumores se deriven de una célula B post-centro germinal que ha comenzado las primeras etapas de diferenciación plasmática. Los tumores ABC frecuentemente muestran trisomía 3, delección de CDKN2A, que codifica INK4A/ARF, y activación constitutiva de la vía del NFκB, y solo raramente tienen translocaciones (14;18). Cuando se comparan con los tumores GCB, los tumores ABC se asocian con tasas inferiores de supervivencia a cinco años después de R-CHOP estándar.
- Tipo inclasificable: no cumplen criterios de PEG para ninguno de los tipos anteriores.

Los métodos utilizados evalúan la expresión de 14 o 27 genes y usan algoritmos para producir un puntaje predictivo lineal. El puntaje tiene una probabilidad asignada de identificar el caso como tipo ABC. Si la probabilidad de ser del tipo ABC es mayor del 90% o menor del 10%, los casos se etiquetan como ABC o GCB, respectivamente. Aproximadamente del 10 al 15% de los casos no cumplen con estos criterios y se los identifica como "inclasificables". El papel que la subclasificación basada en el perfil de expresión génica juega en el diagnóstico y tratamiento de LBDCG se está refinando. Está claro que estos dos subgrupos tienen diferentes resultados después de R-CHOP estándar. También parecen tener diferentes resultados después del tratamiento con nuevos agentes y pueden servir como biomarcadores para la selección del tratamiento (3,4).

Genética en los LBDCG

Las tres translocaciones cromosómicas más comunes en los LBDCG involucran a los oncogenes BCL2, BCL6 y MYC.

– BCL2

El oncogén BCL2 se encuentra en 18q21.33. Las translocaciones de este gen se encuentran en aproximadamente un tercio de los LBDCG, principalmente en el subtipo molecular GCB. Las translocaciones que involucran el gen BCL2 no parecen afectar la supervivencia cuando están presentes como la única anomalía genética, es decir, siempre que la translocación de BCL2 no esté asociada con translocaciones concurrentes que involucren MYC. La expresión de la proteína BCL2 en estos casos no se correlaciona con la t(14; 18). Mientras que el subtipo ABC solo raramente tiene la t(14; 18), las amplificaciones de 18q21 se observan en hasta dos tercios de los casos, lo que proporciona un mecanismo posible para la sobreexpresión de BCL2 en estos tumores. El impacto de la expresión de la proteína BCL2 en los resultados clínicos es controvertido, y se necesitan más estudios para aclarar el impacto pronóstico de la expresión de BCL2 en diferentes subtipos de LBDCG.

– BCL6

El gen BCL6 se encuentra en 3q27.3. Las translocaciones de BCL6 también se encuentran en hasta un tercio de los LBDCG. Existe una tendencia hacia la asociación con el subtipo ABC, pero la presencia de esta aberración genética no parece tener un valor pronóstico independiente.

– MYC

MYC se encuentra en 8q24.21. Las translocaciones que involucran el gen MYC se observan en un 5 a 15% de los casos y confieren un peor pronóstico después del tratamiento con quimioterapia combinada basada en doxorubicina (p. Ej., R-CHOP). En varios estudios se ha visto resultados inferiores principalmente en casos con reordenamiento de MYC que involucra genes de inmunoglobulina y no cuando el MYC se reordena con otros genes asociados (3,5).

Linfomas de doble hit

El término “linfoma de doble hit” se usa para referirse a los casos de linfoma que contienen traslocación del gen MYC junto con traslocación de BCL2 y/o BCL6. En la clasificación de la OMS de 2016 (6), el LBDCG de doble hit se clasifica como linfoma de células B de alto grado, con reordenamientos MYC y BCL2 y/o BCL6. Cuando se trata con quimioterapia R-CHOP, los linfomas MYC/BCL2 de doble hit identificados mediante pruebas genéticas tienen un pronóstico peor que otros LBDCG. También se han descrito translocaciones de doble hit que involucran MYC y BCL6, y, más infrecuentemente, tumores de triple hit con reordenamientos MYC, BCL2 y BCL6. La mayoría de los datos sugieren que estos genotipos también están asociados con resultados clínicos pobres (5).

Linfomas con doble expresión de MYC y BCL2

Si bien los LBDCG con translocación de MYC suelen demostrar una mayor expresión de MYC, algunos tumores tienen sobreexpresión de MYC debido a otros mecanismos (p. Ej., amplificación génica).

En varios estudios independientes, se observó la coexpresión de MYC y BCL2 en un 20 a 30% de los casos de LBDCG y predijo una menor tasa de respuesta completa y una supervivencia libre de progresión y general más corta. Sin embargo, aunque la presencia de una translocación MYC confirió un mal pronóstico independientemente de BCL2, la expresión de la proteína MYC solo se asoció con un peor resultado cuando se acompañó de la expresión de BCL2.

Se necesitan más estudios para aclarar el pronóstico de los linfomas que sobreexpresan BCL2 y MYC basados en inmunohistoquímica. Los casos con sobreexpresión de MYC identificados por esta técnica deben someterse a pruebas genéticas para translocaciones de MYC. Además, dado que los DLBCL de doble hit tienen un pronóstico particularmente precario, también se deben considerar las pruebas de reordenamientos de BCL2 y BCL6 en los casos que presentan altos niveles de expresión de proteína MYC (2).

Algoritmos pronósticos

Como hemos comentado, en la práctica clínica el pronóstico de los pacientes con LBDCG a menudo se estima utilizando el IPI, que refleja una mezcla de diferencias biológicas o genéticas subyacentes. Sin embargo, se ha demostrado que incluso con el mismo puntaje de IPI, los pacientes con LBDCG experimentan distintos cursos clínicos. Para abordar este problema, Hans et al. y Choi et al. (Figura 1) desarrollaron dos algoritmos de clasificación que dividen los casos de LBDCG en el subtipo GCB y no GCB, basado en el análisis inmunohistoquímico. El enfoque de Hans se centró en las expresiones de CD10, Bcl-6 y MUM-1, mientras que el enfoque de Choi agregó GCET1 y

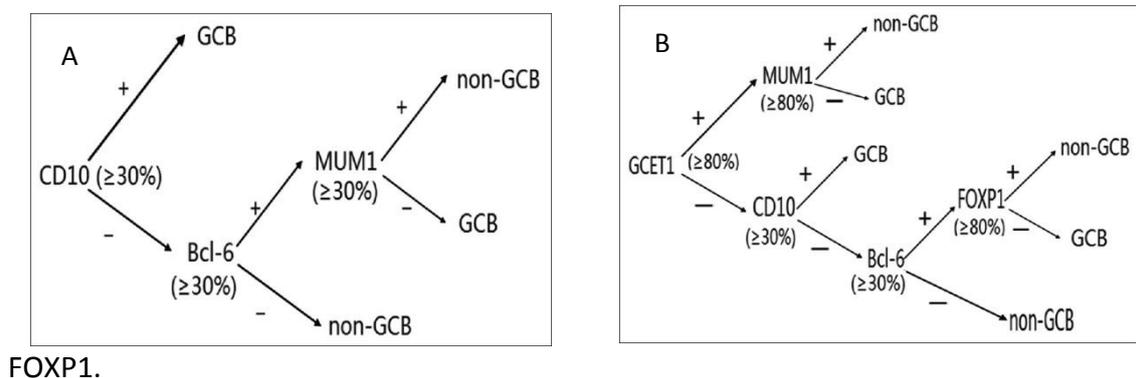


Figura 1. Algoritmos de Hans (A) y Choi (B). El de Hans subclasifica los casos de LBDCG en función de la expresión de CD10, BCL6 y MUM1. Un marcador se considera positivo cuando >30% de las células tumorales expresan la proteína. El algoritmo de Choi está

basado en la expresión de cinco biomarcadores. Comparado con el algoritmo de Hans, el algoritmo de Choi integró el análisis de dos nuevas moléculas: FOXP1 y GCET1, que permitió una mejor discriminación entre los casos LBDCG con subtipo GCB y ABC.

Algunos estudios han informado de que el algoritmo de Hans tiene una tasa de clasificación errónea de 19,7 % cuando se compara con datos de PEG; esto podría deberse a factores técnicos relacionados con la tinción, interpretación y puntuación de los datos. La ventaja de esta técnica es que es factible en la mayoría de los laboratorios de Anatomía Patológica con material FFIP procedente de la biopsia diagnóstica.

En un metaanálisis reciente (7) mientras que el PEG demuestra un valor pronóstico consistente en relación con supervivencia global y libre de progresión, los métodos basados en inmunohistoquímica muestran un valor pronóstico consistente solo para supervivencia libre de progresión.

Terapias disponibles

La etapa avanzada de LBDCG se trata principalmente con quimioterapia sistémica más inmunoterapia con el anticuerpo recombinante anti-CD20 (Rituximab). Si bien los principios de tratamiento general para estadios avanzados se aplican a la mayoría de las presentaciones de enfermedades y poblaciones de pacientes, la implicación de ciertos órganos, particularmente cuando ocurre como sitios primarios de la enfermedad, tiene implicaciones terapéuticas únicas.

Para la mayoría de los pacientes con estadio avanzado, se sugieren seis ciclos de R-CHOP-21 (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisona más Rituximab, administrados cada 21 días). Con este enfoque, las tasas estimadas de SLP y SG a los cinco años son del 70 y el 75% respectivamente.

Actualmente existen ensayos clínicos que evalúan la incorporación de nuevos agentes (p. Ej., R-CHOP + Lenalidomida, R-CHOP + Ibrutinib, R-CHOP + Bortezomib) en casos de fenotipo ABC.

- LBDCG doble hit

Los pacientes con linfomas doble hit tienen mala respuesta a la quimioinmunoterapia convencional y, serían candidatos a terapias más intensivas o participación en ensayos clínicos, en función de la edad y estado clínico.

MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio inmunohistoquímico

La tinción inmunohistoquímica se realizó de la siguiente manera: se cortaron biopsias embebidas en parafina de 2-4 μm de espesor en portaobjetos Dako (DAKO), y posteriormente se desparafinaron, rehidrataron y se sometieron a recuperación de antígeno mediante calentamiento en Tris 50 mM (base Trizma) -1 mM EDTA (ácido

etilendiaminotetraacético) (Sigma Chemical) (pH 8) o citrato 10 mM, pH 6,5 en una olla a presión durante 2 minutos. Los portaobjetos se enfriaron y se trataron con solución bloqueadora de peroxidasa (DAKO) durante 5 minutos.

Las secciones fueron inmunoteñidas con anticuerpos contra MUM1, CD10, BCL6, CD30, MYC y BCL2, contrateñidas con hematoxilina y montadas. Las incubaciones, bien omitiendo el anticuerpo específico o bien conteniendo anticuerpos no relacionados, se usaron como control negativo de la técnica.

Los puntos de corte utilizados para evaluar los casos como positivos o negativos son, según lo descrito en la literatura: MYC (40%) y BCL2 (50%).

FISH

Se han estudiado las alteraciones genéticas en MYC, BCL2 y BCL6 mediante FISH (sondas de tipo *dual-colour Break-Apart* para los reordenamientos de MYC, BCL2 y BCL6). El punto de corte para considerar un caso como positivo mediante esta técnica es del 10%. Se identificaron patrones normales, traslocación o ganancia/amplificación.

PCR cuantitativa alelo específica

Se ha utilizado un ensayo no comercial que usa sondas Taqman (Applied) para la detección de la secuencia *wild type* y mutante (L265P) de MYD88. Se han realizado los experimentos por triplicado y tras PCR a tiempo real se ha calculado el deltaCt de los ensayos mutante y *wild type* y contrastado con el deltaCt del control positivo (línea celular HBL1). Se consideran positivos los casos con una frecuencia de mutación superior al 1%.

Captura de imágenes

Se han digitalizado mediante un escáner (Omnyx, GE) las preparaciones histológicas y de inmunohistoquímica de casos seleccionados. Se han seleccionado áreas representativas a una magnificación de 40X. Se ha utilizado un microscopio de fluorescencia (Olympus) para la captura de imágenes FISH, utilizando filtros específicos. Se han seleccionado áreas representativas a una magnificación de 100X.

RESULTADOS

	Número total de casos	107	
	Tipo de biopsia		
Trucut/BAG		44/107	41,12 %
Escisional		42/107	39,25 %
Incisional		20/107	18,69 %
	Diagnóstico		
LBDCG NOS		96/107	89,72 %
Linfoma B de célula grande mediastínico primario		3/107	2,8 %
Linfoma B rico en células T e histiocitos		4/107	3,74 %
LBDCG + LF concurrente		2/107	1,87 %
LF 3B		2/107	1,87 %
	Fenotipo GCB/no-GCB		
LBDCG NOS tipo GCB		63/96	65,63 %
LBDCG NOS tipo no-GCB		33/96	34,38 %
	Inmunohistoquímica CD30 (%)	46/97	47,42 %
	Inmunohistoquímica MYC (%)	91/97	93,81 %
	Inmunohistoquímica BCL2 (%)	88/97	90,72 %
	Doble positivo IHQ (MYC&BCL2)		
Sí		50/94	53,19 %
No		44/94	46,81 %
	FISH CMYC		
Normal		52/64	81,25 %
Reordenado		9/64	14,06 %
Ganancia/Amplificación sin reordenamiento		3/64	4,69 %
	FISH BCL2		
Normal		52/68	76,47 %
Reordenado		14/68	20,59 %
Ganancia/Amplificación sin reordenamiento		2/68	2,94 %
	FISH BCL6		
Normal		36/59	61,02 %
Reordenado		23/59	38,98 %
	Doble hit (MYC&BCL2 o MYC&BCL6)		
Si		7/81	8,64 %
No		74/81	91,36 %
	Mutación MYD88L265P		
Mutado		3/63	4,76 %
Wild type		60/63	95,24 %

Tabla 1. Se ha realizado un estudio de una cohorte de 107 muestras de pacientes diagnosticados de linfoma, para los cuales hemos valorado diferentes aspectos moleculares, como son la sobreexpresión y reordenamientos de cMYC, BCL2 BCL6 y CD30, para luego poder estudiar si se tratan de LBDCG doble hit.

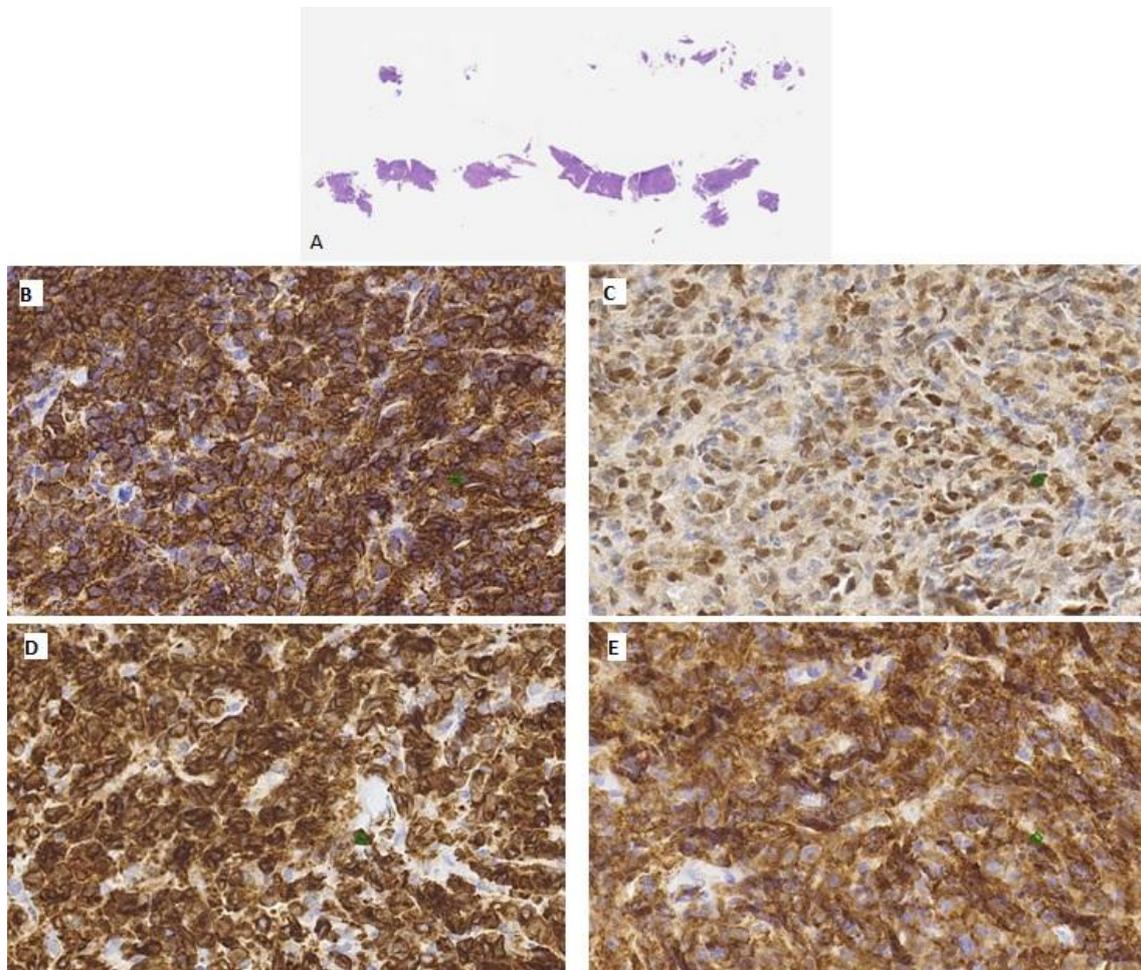


Figura 2. Ejemplo de trucut/biopsia con aguja gruesa (BAG) con LBDCG doble positivo. Se han utilizado las tinciones de H&E (A), CD20 (B), cMYC (C), BCL2 (D) y CD10 (E), respectivamente. Se trata de un LBDCG fenotipo GCB que expresa todos los marcadores mencionados. Casos como este en los que la tinción de BCL2 es tan positiva suelen asociar traslocación de BCL2. Se confirmó el diagnóstico de LBDCG doble hit mediante FISH.

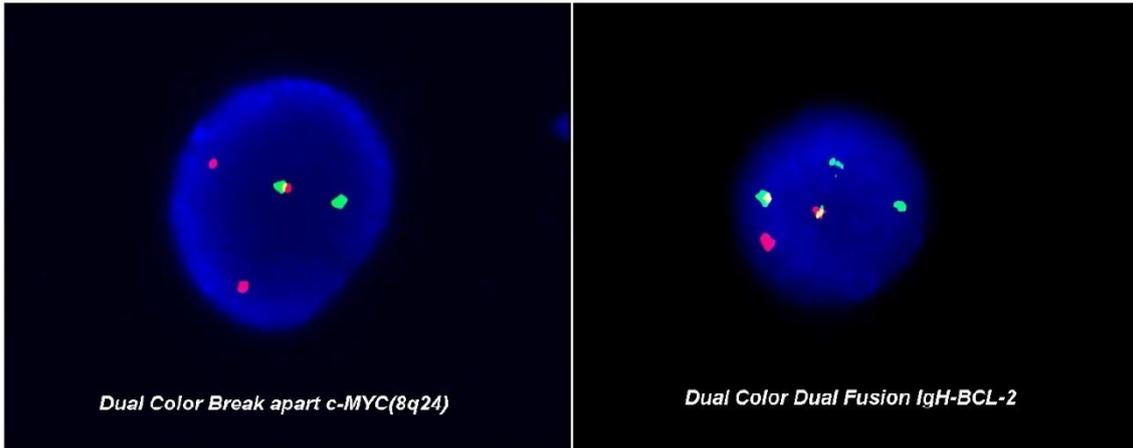


Figura 3. Diagnóstico mediante FISH de un caso de LBDCG doble hit, en el que se aprecia el reordenamiento de MYC mediante la técnica *Break Apart* y el reordenamiento de BCL2 mediante *Dual Fusion*.

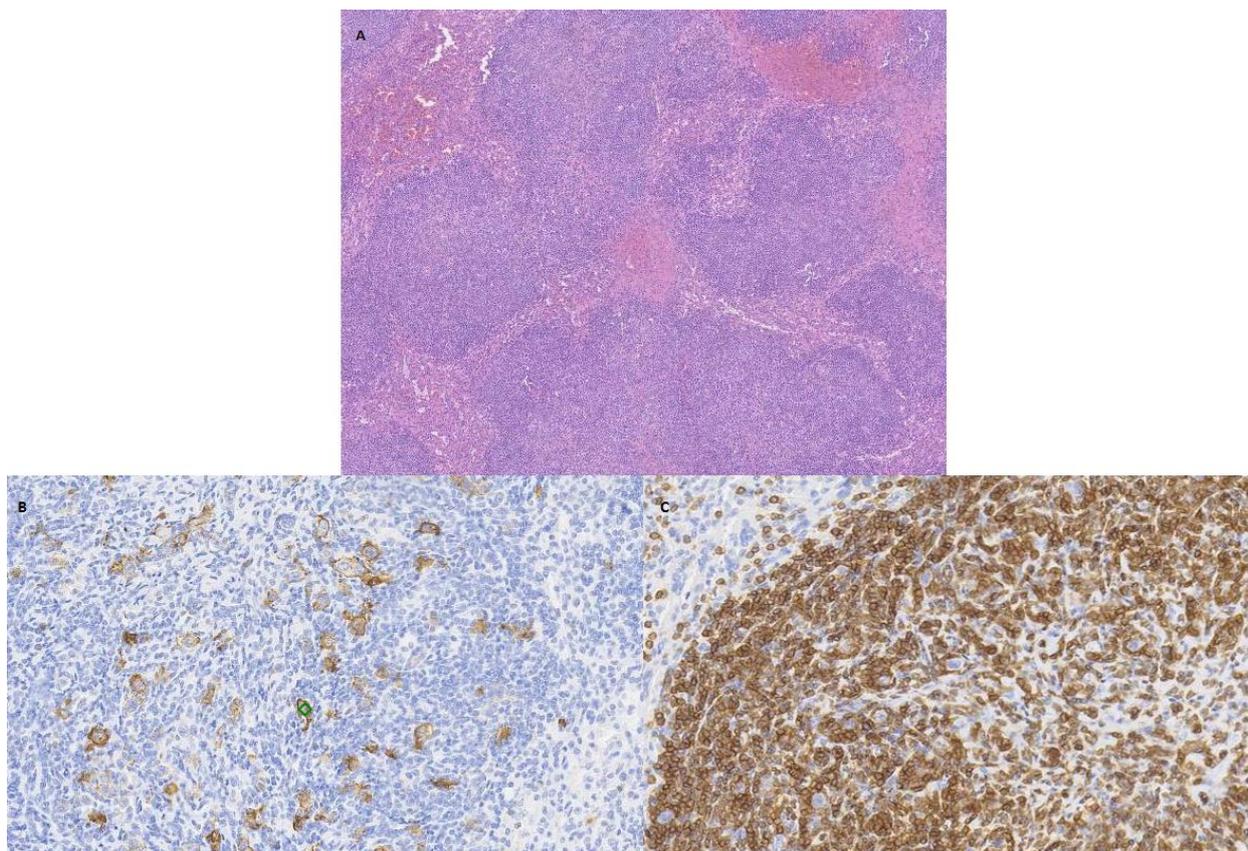


Figura 4. Biopsia de bazo tras esplenectomía. Se llevaron a cabo las tinciones con H&E (A), tinciones para CD20 (B) y para CD3 (C). Podemos apreciar como el patrón no es tan difuso, sino más nodular, y las células son mayoritariamente más pequeñas si lo comparamos con el caso anterior. La tinción de CD20 es positiva en células atípicas minoritarias (blastos neoplásicos). Sin embargo, la tinción de CD3, que es específica de

células de estirpe T, es muy positivo. La imagen se corresponde con un infiltrado de células T pequeñas y algunos blastos esparcidos entre ellas. Con estos datos, se llega al diagnóstico de linfoma B rico en células T e histiocitos.

Tipos de muestra para el diagnóstico

De las 107 biopsias, 43 han sido obtenidas mediante una biopsia-punción tipo trucut (41,12 %), 42 por biopsia escisional (39,25 %) y 20 por biopsia incisional (18,69 %). Cabe destacar que el hecho de que la mayoría se hayan obtenido mediante una biopsia con aguja ha condicionado los resultados de nuestro estudio, pues en muchos casos no ha quedado tejido suficiente para los estudios de FISH y MYD88. Al comprobar esos datos hemos podido observar que, tal y como sospechábamos, 21 de las que no tenemos datos para el FISH se consiguieron mediante trucut, lo que correspondería a un 20% del total. Un 6 % fueron mediante biopsia incisional y un 7 % por biopsia escisional. En cuanto al estudio de MYD88, un 23% del total de muestras fueron recogidas por trucut, un 5% mediante biopsia incisional y otro 5% por biopsia escisional.

Clasificación diagnóstica

En 96 de las 107 muestras se confirmó el diagnóstico de LBDCG NOS, mientras que los demás fueron catalogados como diferentes subtipos, entre los que encontramos 3 muestras de linfoma B de célula grande mediastínico primario, 4 de linfoma B rico en células T e histiocitos, 2 linfoma foliculares concurrentes con LBDCG (de los cuales un caso era un linfoma folicular 3A y otro 3B) y dos linfomas foliculares de tipo 3B.

Fenotipo

Como ya comentamos previamente, los LBDCG pueden clasificarse en GCB, ABC o inclasificable según el genotipo que presenten. En nuestro estudio hemos separado las muestras de LBDCG también en función de este criterio, por lo que hemos obtenido 63 de tipo GCB y 33 de tipo no-GCB. Por tanto, aplicando el algoritmo inmunohistoquímico de Hans, basado en la cuantificación de la expresión de CD10, BCL6 y MUM1 (8) 65,63 % son casos de tipo GCB y el 34,38 % de tipo no-GCB.

Teniendo en cuenta los puntos de corte establecidos para cada marcador, 46 fueron positivas para CD30, 91 para MYC y 88 para BCL2, lo que corresponde con un 47,42 %, 93,81 % y 90,72 % respectivamente.

Además, viendo los datos de la IHQ podemos sacar la conclusión de que un 53,19 % de las muestras corresponden con LBDCG doble positivo (50 de 94 casos). De esos 50 casos que son doble positivo, el 10% se corresponden con linfomas doble hit por técnica FISH. Un 60 % de los doble positivo son GCB.

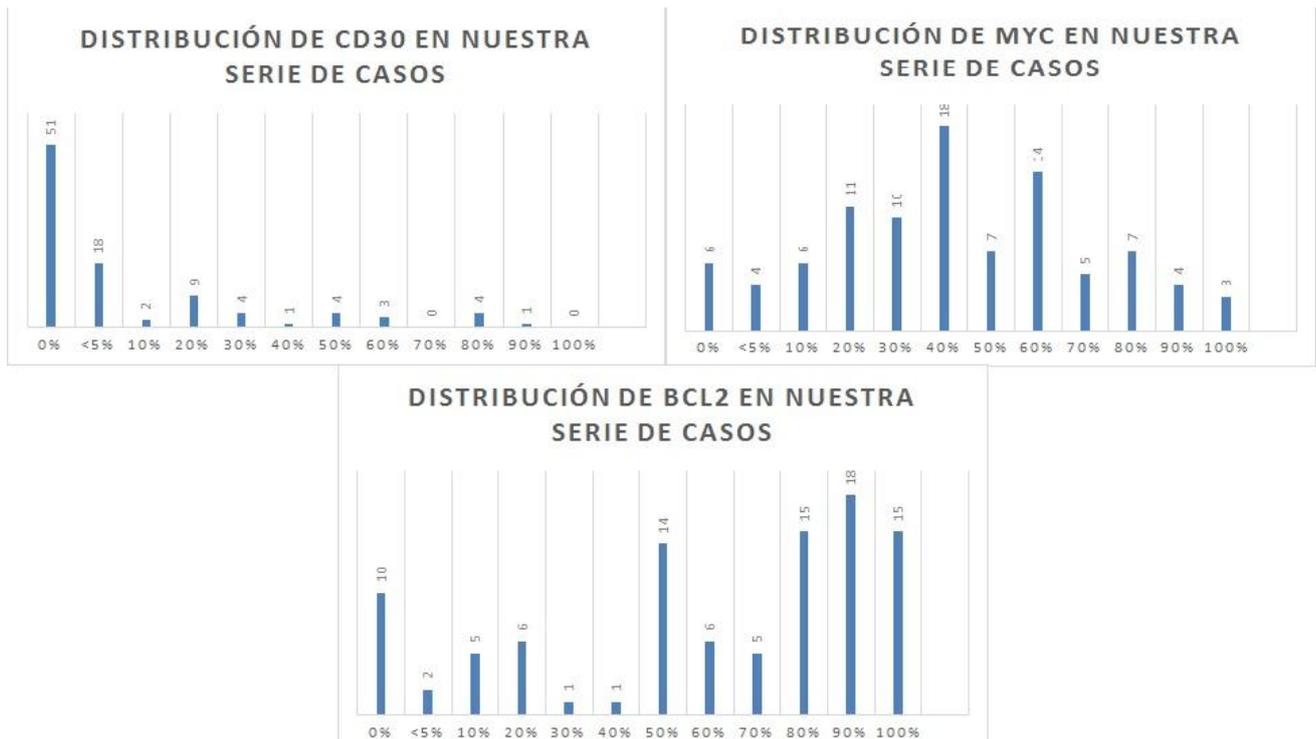


Figura 5. Distribución de expresión inmunohistoquímica de CD30, MYC y BCL2 en nuestra serie de casos. El valor de la mediana se encuentra en el 0 % para el primero de ellos, con un rango de mínimos y máximos de (0, 90). La distribución en este caso es unimodal. La mediana de MYC corresponde con el valor del 40 %, con un rango de (0, 100). La distribución es unimodal, bastante parecida a una distribución gaussiana. En la tercera gráfica vemos la distribución de BCL2. La mediana se encuentra en el 75 %. Los valores mínimos y máximos forman un rango que va de (0, 100%). La distribución es bimodal, con un pico de casos en el 50% de expresión de BCL2 y otro en el 90%.

Estudio de FISH. LBDCG con reordenamientos de MYC, BCL2, BCL6 y linfomas B de alto grado doble hit

El estudio de FISH para cMYC reveló que, en 9 casos que hay con traslocación del gen (14,06 %). En tres casos se observó ganancia o amplificación sin reordenamiento (4,69 %). 52 muestras tienen un patrón normal de un total de 64 (81,25 %). En todos los casos en los que hemos visto reordenamiento, amplificación o ganancia de la proteína MYC se sobreexpresa por IHQ.

En cuanto a BCL2, el número de muestras con el gen normal es el mismo (52 de 68 - 76,47 %-), 14 tienen traslocación (20,59 %) y dos tienen ganancia o amplificación sin reordenamiento (2,94 %). Un 85,71 % de las muestras reordenadas para BCL2 sobreexpresan la proteína en IHQ (12 de 14 casos).

Para BCL6, 23 están reordenadas y 36 son normales, de un total de 59 muestras evaluadas (61,02 % y 38,98 %, respectivamente).

Se identifican siete casos de doble hit. De estos, seis son debidos a reordenamientos concurrentes de MYC y BCL2 y uno a reordenamiento de MYC y BCL6. Los casos que hemos podido evaluar son solo el 75,70 % del total de muestras que tenemos. Analizando más en profundidad los datos que nos proporciona nuestro análisis, observamos que, de estos siete casos, el 85,71 % se corresponden con LBDCG doble positivo (lo que serían seis de siete casos). El único caso de nuestra cohorte que no es doble positivo expresa MYC y BCL2. Todos los casos con DH tienen un fenotipo GCB.

LBDCG con mutación de MYD88L265P

La mutación somática MYD88L265P se identificó en 3 casos (3 de 63, 4,76 %), mientras que las otras 60 de 63 son *wild type*. Dos de estos tres casos mutados, dos fueron diagnosticados como genotipo no-GCB y uno como GCB. Uno de los no-GCB y el GCB se mostraron como doble positivos. Además, el caso que no era doble positivo de estos tres era el único que expresaba CD30 en IHQ. Ninguna de las muestras mutadas era un linfoma doble hit.

DISCUSIÓN

Obtención de la muestra

Hemos visto que la mayoría fueron recogidas mediante biopsia por trucut. Este método suele utilizarse en pacientes cuyas adenopatías están situadas en planos profundos a los cuales no puede llegarse mediante una cirugía menor, o en los que están demasiado inestables como para someterse a un procedimiento invasivo. A pesar de la aparente mayor facilidad de la biopsia por aguja gruesa, nos deja varios inconvenientes, pues la cantidad de tejido recogido es mucho menor que en los otros métodos y esto conlleva a que en muchas ocasiones la muestra no sea suficiente como para llevar a cabo todos los estudios.

Sería recomendable obtener, en la mayoría de los casos biopsias de tipo escisional o incisional para el diagnóstico de linfoma. En el caso de obtener muestras de tipo trucut es necesario protocolizar el número de muestras y el panel de marcadores que se realizan sobre ellas para asegurar el mayor rendimiento diagnóstico posible de las mismas.

Diagnóstico

En nuestro estudio, un 89,72 % de las muestras fueron diagnosticadas como LBDCG NOS, que es la forma más frecuente de linfoma B difuso de célula grande. Otras variantes menos comunes como el linfoma B difuso mediastínico primario, linfoma B rico en células T e histiocitos también se encuentran representadas. Es llamativa la presencia de 2 casos de Linfoma B folicular, grado 3B, que no se considera, estrictamente un linfoma B difuso de célula grande. En comparación con estudios de

revisión centralizada del diagnóstico de linfoma (9), existe un porcentaje similar de discordancia en el diagnóstico de casos de LBDCG entre los centros de origen del caso y el centro de referencia. En ninguno de estos casos se modificó la terapia.

Fenotipo GCB/no-GCB

Como hemos comentado anteriormente, los LBDCG deben ser clasificados en GCB o no-GCB, ya que esta división aporta valor al pronóstico del paciente. En nuestra cohorte de casos, el 65,63 % se correspondía con el subtipo GCB, mientras que el otro 34,38 % era del subtipo no-GCB.

Estos datos concuerdan con los de los estudios revisados, pues una mayoría de los LBDCG se clasifican como GCB en un porcentaje alrededor del 60 % (3,5).

En un estudio concreto con una cohorte de 475 pacientes, el 49 % fueron catalogados como subtipo GCB, 42 % como ABC e inclasificables el 9 % mediante GEP. Sin embargo, de acuerdo con el algoritmo de Hans y Choi para la clasificación mediante IHQ, el 53 % se clasificaron como GCB y el 47 % como no-GCB. Los algoritmos de Choi y Hans podría asignar correctamente 90,1 % y 87,3 % de los casos, respectivamente (4).

Varios estudios han demostrado que los algoritmos de IHQ pueden discriminar entre los subtipos GCB y no-GCB con una concordancia del 80% con respecto a PEG. La actual clasificación de la OMS recomienda el uso de los algoritmos de IHQ para la subclasificación pronóstica del LBDCG si no se dispone de métodos basados en expresión génica (6).

Expresión inmunohistoquímica de MYC, BCL2 y CD30

El porcentaje medio de positividad para MYC y BCL2 en IHQ en los estudios analizados ronda el 40 % y el 70%, respectivamente (10). Estos datos son muy próximos a nuestros resultados, ya que nuestra mediana se situaba en también en 40 % para MYC y en 75 % para BCL2.

La expresión de CD30 se detectó en el 25% de los casos evaluados en un análisis concreto, siendo el grupo mayoritario positivo en un rango del 0 % al 10% (11). En nuestro estudio, un 47,42 % mostró positividad para este marcador en IHQ. Además, nuestro rango de positividad predominante es también del 0 % al 10 %.

Sin embargo, los patrones de expresión de CD30 y su impacto clínico en LBDCG no están bien descritos hasta ahora. Se ha visto que CD30 se expresa en una proporción sustancial de LBDCG y la inmunohistoquímica de este puede ser un marcador pronóstico útil en pacientes tratados con R-CHOP (11).

Doble positivo

Se determinan como doble positivos los casos en los que la expresión de MYC y BCL2 se encuentra aumentada más de un 40 % y 50 % respectivamente.

La doble positividad de MYC y BCL2 se aprecia en el 53,19 % de nuestras muestras evaluables. De estos, el 10 % se corresponde con un LBDCG doble hit. Un 60 % de los doble positivo son GCB.

En los estudios realizados en series retrospectivas, los casos de LBDCG suelen encontrarse entre un 20 % y un 35 % (dependiendo de los datos y las características de cada análisis) y en una mayoría de fenotipos no-GCB (3,10).

Estudio FISH

Se observaron reordenamientos de MYC en el 14,06 % de las muestras evaluables, reordenamientos de BCL2 en el 20,59 % y de BCL6 en el 38,98 %.

Los porcentajes obtenidos para reordenamientos de estos genes en la literatura son semejantes a los que hemos obtenido en nuestro estudio.

Linfoma B de alto grado con doble hit.

Aunque se ha establecido que los pacientes con LBDCG doble hit (con traslocaciones que afectan a MYC y BCL2) tienen un pronóstico considerablemente más pobre que el resto, los estudios muestran que estos pacientes representan solo en torno al 5-10 % de todos los LBDCG (7,10).

En nuestra cohorte, un 8,67 % se corresponden con LBDCG doble hit. El fenotipo de estos casos es de tipo GCB y, en el 85%, doble positivo. En todos los casos se observó expresión de MYC y BCL2 mediante IHQ. No obstante, la prevalencia de los casos doble hit mediante FISH es inferior a la observada para los casos doble positivo mediante IHQ, como se ha descrito en la literatura.

La identificación de este subgrupo de casos de linfoma B de alto grado con doble hit puede tener implicaciones terapéuticas directas ya que se ha demostrado que la quimioinmunoterapia convencional no es suficientemente efectiva.

Estudio molecular de MYD88

En LBDCG la mutación L265P de MYD88 se encuentra de forma más frecuente en los subtipos ABC, sobre un 30 %, y en los linfomas extraganglionares predominantemente. Se ha descubierto que la mutación somática del gen MYD88 (MYD88L265P) activa NF- κ B. NF- κ B es un complejo de proteínas que activan la transcripción de genes relacionados con la supervivencia celular y apoptosis.

En cuanto a mutaciones de MYD88, se han encontrado muchas diferentes pero la mayoría no tiene una significación clínica relevante. La que más nos interesa es la sustitución de leucina por prolina en la posición 265, que es precisamente la que hemos estudiado en nuestro análisis mediante PCR cuantitativa, alelo específica.

Hemos identificado la mutación MYD88L265P en 3 casos (4%). Esta prevalencia es inferior a la encontrada en la literatura, aunque podría explicarse debido al origen primariamente ganglionar de los casos incluidos en este estudio. De nuestros tres casos en los que teníamos mutación de MYD88L265P, dos son LBDCG no-GCB, de acuerdo con lo descrito en la literatura.

CONCLUSIÓN

El tipo de muestra obtenido con la biopsia condiciona los estudios complementarios que se pueden realizar sobre la misma. Por ello, sería necesario protocolizar el método por el que se lleva a cabo la biopsia y los paneles de técnicas complementarias (IHQ, FISH y estudios moleculares) para obtener el mayor rendimiento posible de la muestra.

Hemos comprobado que la IHQ es una buena técnica para fenotipar y distinguir los subgrupos de LBDCG. Con esto podemos clasificar a los pacientes según el pronóstico que nos sugieran los marcadores y, eventualmente, podremos aplicar terapias específicas que más se ajusten a las necesidades biológicas de su enfermedad. Un ejemplo que ilustra lo que comentamos en CD30.

Por otra parte, el estudio de FISH permite identificar un reducido número de casos con diagnóstico de linfoma B de alto grado doble hit que se hubieran clasificado como GCB mediante IHQ. Es necesario tener en cuenta las limitaciones de las técnicas de inmunohistoquímica para que, ante un primer diagnóstico de LBDCG podamos completar el estudio y dar un diagnóstico más fiable de cara a las posibilidades terapéuticas.

La prevalencia y el impacto de nuevos marcadores moleculares como la mutación MYD88L265P requiere de más investigación.

BIBLIOGRAFÍA

1. Freedman AS, Aster JC. Epidemiology, clinical manifestations, pathologic features, and diagnosis of diffuse large B cell lymphoma - UpToDate [Internet]. Jul 20. 2017 [cited 2018 Apr 23]. Available from: https://www-uptodate-com.scsalud.a17.csinet.es/contents/epidemiology-clinical-manifestations-pathologic-features-and-diagnosis-of-diffuse-large-b-cell-lymphoma?search=DLBCL&source=search_result&selectedTitle=1~125&usage_type=default&display_rank=1#H886760
2. Freedman AS, Aster JC. Prognosis of diffuse large B cell lymphoma - UpToDate [Internet]. May 16. 2017 [cited 2018 Apr 23]. Available from: https://www-uptodate-com.scsalud.a17.csinet.es/contents/prognosis-of-diffuse-large-b-cell-lymphoma?sectionName=MOLECULAR_GENETICS&topicRef=4703&anchor=H14049196&source=see_link#H849415543
3. Batlle-López A, de Villambrosía SG, Francisco M, Malatxeberria S, Sáez A, Montalban C, 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* [Internet]. 2016 Apr 5 [cited 2018 Apr 23];7(14):18036–49. Available from: <http://www.oncotarget.com/fulltext/7495>
4. Visco C, Li Y, Xu-Monette ZY, Miranda RN, Green TM, Li Y, 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* [Internet]. 2012 Sep 22 [cited 2018 Apr 23];26(9):2103–13. Available from: <http://www.nature.com/articles/leu201283>
5. Aukema SM, Siebert R, Schuurin E, Van Imhoff GW, Kluin-Nelemans HC, Boerma E-J, et al. Double-hit B-cell lymphomas. *Blood* [Internet]. 2011 [cited 2018 Apr 23];117(8):2319–31. Available from: <http://www.bloodjournal.org/content/bloodjournal/117/8/2319.full.pdf>
6. Swerdlow SH, World Health Organization, International Agency for Research on Cancer. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues [Internet]. [cited 2018 Jun 7]. 585 p. Available from: <https://www.amazon.com/Classification-Tumours-Haematopoietic-Lymphoid-Tissues/dp/928324494X>
7. Read JA, Koff JL, Nastoupil LJ, Williams JN, Cohen JB, Flowers CR. Evaluating Cell-of-Origin Subtype Methods for Predicting Diffuse Large B-Cell Lymphoma Survival: A Meta-Analysis of Gene Expression Profiling and Immunohistochemistry Algorithms. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* [Internet]. 2014 Dec [cited 2018 Jun 5];14(6):460–467.e2. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25052052>

8. Yoon N, Ahn S, Yoo HY, Kim SJ, Kim WS, Ko YH. Cell-of-origin of diffuse large B-cell lymphomas determined by the Lymph2Cx assay: better prognostic indicator than Hans algorithm. *Oncotarget* [Internet]. 2017 Mar 28 [cited 2018 Apr 19];8(13):22014–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28423544>
9. Laurent C, Baron M, Amara N, Haioun C, Dandoit M, Maynadié M, et al. Impact of Expert Pathologic Review of Lymphoma Diagnosis: Study of Patients From the French Lymphopath Network. *J Clin Oncol* [Internet]. 2017 Jun 20 [cited 2018 Jun 7];35(18):2008–17. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28459613>
10. Green TM, Young KH, Visco C, Xu-Monette ZY, Orazi A, Go RS, 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. *J Clin Oncol* [Internet]. 2012 Oct 1 [cited 2018 Jun 5];30(28):3460–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22665537>
11. Slack GW, Steidl C, Sehn LH, Gascoyne RD. CD30 expression in *de novo* diffuse large B-cell lymphoma: a population-based study from British Columbia. *Br J Haematol* [Internet]. 2014 Dec [cited 2018 Jun 7];167(5):608–17. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25135752>