



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLAS DE
HIDALGO**

**FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS
"DR. IGNACIO CHÁVEZ"
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**



Tesis:

**“RELACIÓN DE MARCADORES PRONÓSTICOS CON LA SUPERVIVENCIA
EN LOS PACIENTES CON DIAGNÓSTICO DE LINFOMAS DE CÉLULAS B
MADURAS DE ALTO GRADO”**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS DE LA SALUD

P R E S E N T A:

MÉDICO CIRUJANO Y PARTERO
ESPECIALISTA EN ANATOMÍA PATOLÓGICA
MORELOS VILLASEÑOR AGUIRRE

Dirección de tesis:
Doctor en Ciencias en Biología Celular
Carlos Cortés Penagos

Morelia, Michoacán,
Septiembre 2018

El Comité Tutorial designado por la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez” de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo aprobó la tesis presentada por:

Médico cirujano y partero
Especialista en anatomía patológica
Morelos Villaseñor Aguirre

Doctora en Ciencias Químico-Biológicas
Martha Eva Viveros Sandoval
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Doctora en Ciencias Biológicas
Ana Edith Higareda Mendoza
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Médico Especialista en Hematología
Sergio Cuin Macedo
Instituto Mexicano del Seguro Social

Doctora en Farmacología
Annel Gómez García
Instituto Mexicano del Seguro Social

Esta tesis fue realizada en el programa de posgrado
Maestría en Ciencias de la Salud de la
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo
acreditado en el Programa Nacional de Posgrado de Calidad – CONACYT
como Programa Consolidado

La presente investigación se realizó en:

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas

Dr. Ignacio Chávez

División de estudios de posgrado

Laboratorio de Biología Molecular

Instituto Mexicano del Seguro Social

Hospital General Regional No. 1 Charo

Departamento de Hematología

Número de Registro SIRELCIS R-2017-1602-15

Charo Michoacán a 17 de Mayo del 2017.

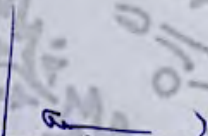
ASUNTO: Autorización para realizar proyecto de investigación en Salud.

DR. SERGIO IVAN CUIN MACEDO
INVESTIGADOR PRINCIPAL
PRESENTE

Sirva el presente para informar a Usted que en atención a su solicitud de autorización para la revisión de las laminillas del servicio de patología de este hospital y que corresponden a pacientes con diagnóstico de Linfoma en sus diferentes caracterizaciones con el propósito de llevar a cabo el protocolo de investigación titulado **“Relación marcadores pronósticos con la supervivencia y la respuesta a tratamiento en los pacientes con diagnóstico de linfomas de células B maduras de alto grado”**. Considero que el protocolo planteado es de suma importancia en la generación de conocimiento de una de las neoplasias que afecta a nuestra población por lo que AUTORIZO para que realice esa actividad siguiendo toda la normatividad en Investigación y Ética establecida por el Instituto Mexicano del Seguro Social y la Normatividad Nacional.

Sin más de momento, aprovecho este conducto para enviarles afectuoso saludo.

Atentamente
“Seguridad y Solidaridad Social”


DR. JOSÉ ANDRÉS ALVARADO MACÍAS
Director del HGR No. 1. Charo

C.c.p. Dra. Irma Hernández Castro. CCEIS HGR No. 1 Charo.



Agradecimientos

A manera de un sencillo homenaje dedico este trabajo a mi familia, supongo que los éxitos no son nada sin ellos, no tiene sentido llegar muy alto o muy lejos, si al final de la jornada no hay con quien compartir dichos momentos.

A mis padres por su ejemplo, por su apoyo incondicional, por compartir su sabiduría. Esperando sientan, por lo menos, una cuarta parte del orgullo que yo siento al decir que son mis padres.

A mi esposa por su entereza en mis horas de ausencia, por siempre inspirarme, al ver el amor y la pasión que les imprime a todos sus proyectos, pero sobre todo por siempre estar allí, a mi lado.

A mis hermanos por enseñarme que existen mil y una maneras de pensar, aun creciendo bajo el mismo techo, demostrando que nos criaron con la libertad de escoger nuestros propios senderos.

A la vida, también, gracias...

ÍNDICE GENERAL

1. Introducción	1
2. Marco Teórico	2
2.1 Antecedentes	2
2.2 Linfoma Difuso de Células Grandes B	7
2.2.1 Marcadores en el Linfoma Difuso de Células Grandes B	8
2.3 Linfoma Burkitt	9
2.3.1 Marcadores en el Linfoma Burkitt	10
2.4 Linfoma "B" no Clasificable con Características Intermedias entre LDCGB y LB	11
2.5 Linfomas Doble Hit / Linfomas de Alto Grado	12
2.6 Índice Pronóstico Internacional	13
2.7 Mutaciones de interés	14
2.7.1 MYC	14
2.7.2 BCL6	18
2.7.3 BCL2	19
2.7.4 P53	20
2.7.5 Ki67	20
2.8 Tratamiento	21
3. Justificación	22
4. Hipótesis	23
5. Objetivo General	23
6. Objetivos Específicos	23
7. Material y Métodos	24
7.1 Tipo de Estudio	24
7.2 Diseño de Estudio	24
7.3 Universo de trabajo	24
7.4 Criterios de Selección	24
7.5 Criterios de no inclusión	25

7.6 Criterios de exclusión	25
7.7 Variables de estudio	25
7.8 Periodo de estudio	25
7.9. Descripción operativa	27
7.10 Inmunohistoquímica	28
7.11. Análisis estadístico	31
7.12. Aspectos éticos	31
8. Resultados	32
9. Discusión	38
10. Conclusiones	41
11. Perspectivas	42
12. Bibliografía	43

ÍNDICE DE FIGURAS

1	Incidencia y mortalidad de linfomas a nivel mundial en ambos sexos	4
2	Clasificación de la OMS para neoplasias linfoproliferativas	6
3	Esquema de mutación de MYC t(8;14)	15
4	Acción de TCF3 sobre MYC	17
5	Esquema de BCL6	18
6	Esquema de mutación de BCL2	20
7	Obtención de material biológico del bloque de parafina	28
8	Ejemplos de laminillas de Inmunohistoquímica	28
9	Distribución de la población de estudio por genero y tipo de linfoma	33
10	Macroarreglo de cortes histológicos para análisis inmunohistoquímico	33
11	Fotomicrografía representativa de la expresión de los marcadores de estudio	34
12	Prevalencia de la expresión de los marcadores BCL2, BCL6y p53 en la población de estudio	34
13	Clasificación de la población de estudio basado en el IPI	35
14	Asociación del IPI con el tipo de entidad analizada	35
15	Fotomicrografía representativa de la expresión de p53	36
16	Expresión de Ki67	36
17	Sobrevida en pacientes con o sin expresión de BCL2 y BCL6	37
18	Sobrevida en pacientes con expresión de BCL2, BCL6, p53 y Ki67	37
19	Vía de activación de p53	40

ÍNDICE DE TABLAS

I	Diferencias y similitudes de los linfomas de Células B maduras de alto grado	13
II	Índice pronóstico internacional	14
III	Clasificación Ann Arbor	14
IV	Sobrevida y progresión de la enfermedad con respecto al IPI	14
V	Variables utilizadas en el estudio	26
VI	Clasificación de la población de estudio	32

ABREVIATURAS

BCLU	Linfoma de características intermedias entre LB y LDCGB.
CG	Centro germinal.
CHOP	Ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisona. Ciclofosfamida, vincristina, doxorubicina, metotrexate, ifosfamida,
CODOX-M/IVAC	etoposido, citarabina.
CVAD	Ciclofosfamida, vincristina, doxorubicina, dexametasona. Dosis ajustada de rituximab, etoposido, vincristina, ciclofosfamida,
DA-REPOCH	doxorubicina.
DHL	Deshidrogenasa láctica.
FISH	Hibridación in situ con fluorescencia.
IGH	Cadenas pesadas de la inmunoglobulina.
IGL	Cadenas ligeras de la inmunoglobulina.
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social.
IPI	Índice pronóstico internacional.
IVAC	Ifosfamida, etoposido, citarabina.
LB	Linfoma Burkitt.
LDCGB	Linfoma Difuso De Células Grandes "B".
LNH	Linfoma No Hodgkin.
OMS	Organización Mundial de la Salud.
RCHOP	Rituximab, ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisona.
REAL	Revisión De La Clasificación Europea y Americana De Neoplasias Linfoides.
REPOCH	Doble dosis de rituximab, etoposido, vincristina, ciclofosfamida, doxorubicina.
RHyper-CVAD	Ciclofosfamida, vincristina, doxorubicina, dexametasona, alternado con dosis altas de metotrexate y citarabina mas rituximab.

RESUMEN

Introducción. Algunas neoplasias linfoides llamados Linfomas de Alto Grado (Linfoma difuso de células grandes B, Linfoma Burkitt y Linfoma no Clasificable de características intermedias entre Linfoma Burkitt y Linfoma Difuso de células grandes B / según la clasificación de la OMS 2008) pueden presentar mutaciones de manera sincrónica. Algunas de las mutaciones más estudiadas son BCL2, BCL6 y p53. En otros países se ha reportado que a mayor número de mutaciones estas neoplasias desarrollarían un comportamiento más agresivo, que requeriría de tratamientos farmacológicos más intensos. En México no se realizan estudios moleculares, por lo que en este grupo de pacientes no se aplicaría el tratamiento adecuado, aumentando las recaídas y disminuyendo la supervivencia. **Objetivo.** Demostrar que BCL2, BCL6, Ki67 y p53 son marcadores pronósticos directamente relacionados con la supervivencia y con la respuesta al tratamiento de los pacientes con diagnóstico de linfomas de células “B” maduras de alto grado en el IMSS. **Metodología.** Se desarrolló un tipo de estudio descriptivo, retrospectivo en el Hospital Regional del IMSS Morelia #1 donde se identificaron los pacientes con diagnóstico de linfomas de células B maduras de alto grado, que ingresaron al departamento de hematología, en el periodo que abarcó del 01 de enero del 2013 al 31 de diciembre 2015. Posteriormente se acudió al departamento de anatomía patológica para solicitar el material biológico, se revisaron los casos con apoyo del estudio de inmunohistoquímica. Los pacientes que cumplieron con los criterios fueron sometidos a estudio de búsqueda de alteraciones en BCL2, BCL6, Ki67 y p53, evaluándose por expresión de proteínas, por técnica de inmunohistoquímica. Se analizó la sobrevida y recaídas de estos pacientes durante mínimo dos años de evolución de la enfermedad o hasta el deceso, se realizó un análisis comparativo del índice pronóstico internacional con la expresión de dos o tres marcadores, con respecto a la sobrevida y al número de recaídas de cada paciente, evaluando la respuesta al tratamiento. **Resultados;** encontramos una disminución en la sobrevida y aumento en número de recaídas de los pacientes que presentaron la coexpresión de BCL2, BCL6, Ki67 elevado por arriba del percentil 85 y disminución de p53 por debajo del percentil 25. **Conclusiones;** se debe realizar estudios de inmunohistoquímica para determinar la expresión de BCL2, BCL6, Ki67 y p53 a todos los pacientes con diagnóstico de Linfoma de Células “B” Maduras de Alto Grado y así poder ofrecer el tratamiento adecuado desde el momento del diagnóstico.

Palabras claves: Linfomas alto grado - marcadores pronóstico, sobrevida, respuesta a tratamiento, mutaciones.

ABSTRACT

Introduction: Some called High-Grade lymphoid neoplasm (Lymphoma, diffuse large cell lymphoma, Burkitt Lymphoma, and B not Classifiable of characteristics intermediate between Burkitt lymphoma and diffuse large B cell lymphoma / according to the World Health Organization classification 2008) may have mutations synchronously. Some of the most studied mutations are BCL2, BCL6 and p53. Other countries reported that the greater number of mutations these neoplasms the more aggressive behavior, requiring more intense pharmacological treatments. In Mexico molecular studies on this type of mutations, don't occur routinely in this group of patients do not apply the proper treatment, increasing the number of relapses and decreases survival. **Objective:** demonstrate that BCL2, BCL6 and P53 are prognostic markers directly associated with survival and response to the treatment of patients with a diagnosis of lymphomas of mature "B" cells of high degree at Mexican Institute of Social Security. **Methodology:** a kind of retrospective descriptive study was developed at the Regional Hospital of IMSS Morelia #1 where patients were identified with diagnosis of lymphomas of mature B cells of high degree, who have entered the Department of Hematology, in the period from January 01 2013 to December 31 2015. Subsequently a request to the anatomical pathology department will be sending biologic material where the histopathological diagnosis took place, the cases were reviewed again with the support of the study of Immunohistochemistry. Patients who met the morphological criteria to be considered a mature B cells from High-Grade lymphomas were submitted to a study alteration in BCL2, BCL6 and p53 will be evaluated by the expression of protein by immuno-Histochemistry technique, the co-expression of BCL2, BCL6, ki67 and p53 proteins were identified. The life and relapses of these patients were analyzed for at least two years of evolution of the disease or even death, a comparative analysis of the International Prognosis Index (IPI) of these patients with the presence of two or three mutations was carried on, with respect to the survival and number of relapses of each patient, evaluating the response to different treatments to which they were subjected. **Results:** we found a decrease in survival and increase in number of relapses in patients who presented the co-expression of BCL2, BCL6, 85 percentiles high above Ki67 and p53 below the 25-percentile decrease. **Conclusions:** molecular studies must be realized to identify translocation of MYC and Immunohistochemistry to determine BCL2, BCL6, Ki67 and p53 expression to all patients with a diagnosis of Lymphomas Cells "B" mature in high grade and be able to offer the right treatment since the moment of the diagnosis.

Key words: High-Grade lymphoid neoplasm - prognostic markers.

1. INTRODUCCIÓN

Linfoma es el nombre que se otorga a cierto grupo de neoplasias que se originan en el sistema linfático. Las dos grandes categorías en las que se clasifican para su estudio son: a) Linfomas Hodgkin y b) los Linfomas No Hodgkin. Al rededor del 90% de las personas que padecen un tipo de linfoma son de tipo No Hodgkin (LNH). (Walter John et al 2017). Actualmente los linfomas LNH se han convertido en un problema de salud pública a nivel mundial. (Labardini et al 2011). En México se ha detectado un incremento en la incidencia de linfomas, algunos de ellos presentando un comportamiento clínico más agresivo. En diversas publicaciones se ha sugerido que este comportamiento más agresivo pudiera estar asociado a la presencia sincrónica de múltiples mutaciones somáticas, desencadenando así un proceso de acumulación de defectos que conllevaría como producto final a la enfermedad (Sietse M. A. et al 2011).

Actualmente la clasificación más aceptada, en este tipo de neoplasias, es la que estableció la Organización Mundial de la Salud en el 2008, la cual está basada en aspectos morfológicos, inmunofenotípicos y genéticos. Es de interés particular estudiar más a detalle las características de cierto tipo de Linfomas No Hodgkin, y que están considerados dentro de las neoplasias de células B maduras de alto grado, esto es, Linfomas Difusos de Células Grandes B (LDCGB), los Linfomas Burkitt (LB) y los Linfomas No Clasificables con características intermedias entre LDCGB y LB (Swerdlow et al 2008). Resulta relevante evaluar la presencia sincrónica de múltiples mutaciones somáticas, que pueden contribuir a un comportamiento biológico más agresivo en este tipo de neoplasias.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes

El lugar donde residen las células inmunes recibe el nombre de tejido linfoide y es allí donde presentaran su transformación a células inmunocompetentes. Estos tejidos linfoides se dividen en dos grupos: tejido linfoide central y tejido linfoide periférico. La medula ósea y el timo constituyen los tejidos linfoides primarios o centrales, es en ese lugar donde se llevará a cabo el proceso de diferenciación independiente de antígeno. En la medula ósea se generarán los linfocitos inmaduros B y T. Los linfocitos inmaduros de tipo T que fueron generados en la medula ósea, se trasladarán al timo, un órgano linfoide primario donde los linfocitos T sufrirán cambios de diferenciación con un reordenamiento del gen del receptor de la célula T (TCR) (Meledo y Mate 2015).

Se consideran órganos linfoides periféricos a los ganglios, el bazo y el tejido linfoide asociado a mucosas, en ellos, las células linfoides B y T tendrán estimulación antigénica y presentara una diferenciación dependiente de cada antígeno. El ganglio linfático está constituido por una estructura como son folículos linfoides con centros germinales. Las células linfoides B inmaduras que provienen de la medula ósea, junto con las células presentadoras de antígeno (células dendríticas), formaran los folículos primarios, que carecen de centro germinal, al momento de recibir estimulación antigénica, se producirá su expansión dando lugar a los folículos linfoides secundarios, que se componen por un centro germinal, una zona del manto y una zona marginal (Meledo y Mate 2015).

El centro germinal esta constituidos por dos tipos de células, los centroblastos, linfocitos tipo B de tamaño intermedio a grande, con uno o varios nucléolos cerca de la membrana nuclear, este tipo de células prolifera con gran rapidez, durante este proceso sufren un gran número de mutaciones en la región V del gen de las inmunoglobulinas, lo que se conoce como hipermutación somática. A consecuencia de este complejo proceso, se consigue aumenta la variabilidad de las inmunoglobulinas producidas, de tal manera que alguna presentara mayor afinidad por el antígeno. Los centroblastos maduran a centrocitos que son linfocitos de menor tamaño con núcleo irregular, los cuales experimentaran un cambio de isotipo de inmunoglobulina (de la expresión constante de la región de la cadena pesada de

las inmunoglobulinas), de forma que pasaran de ser IgM a IgG, IgA o en menor frecuencia IgE (Meledo y Mate 2015).

Aquellos centrocitos que hayan perdido su afinidad por el antígeno, debido al proceso de hipermutación somática, morirán mediante apoptosis, mientras que mantuvieron una afinidad se perpetuaran gracias las células dendríticas y las células T helper específicas de antígeno del centro germinal. De manera más externa se encuentra la zona del manto, la cual contiene linfocitos inmaduros, los cuales entraran al centro germinal al ser estimulados por un antígeno. Otros órganos linfoides periféricos como el bazo, el tejido linfoide asociado a mucosa y los ganglios mesentéricos, contiene una zona aún más externa a la zona del manto, la cual es denomina la zona marginal, la cual contiene tanto linfocitos B de memoria como linfocitos inmaduros (Meledo y Mate 2015).

Las neoplasias de células linfoides reflejan en buena medida los diferentes estadios de maduración de dichas células linfoides B, presentando características morfológicas y de inmunofenotipo. Gracias a esta similitud al estado de maduración de la célula que dio origen se pueden clasificar los linfomas. Así por ejemplo los linfomas del manto, la leucemia linfocítica crónica o linfoma de células pequeñas se cree que se originaron de los linfocitos inmaduros de la zona del manto. Dentro del centro germinal se cree que derivan otras neoplasias como son el linfoma folicular, el linfoma Burkitt, y algunos tipos de linfomas difusos de células grandes B y todos ellos se caracterizan por la expresión de CD10 y BCL6. El linfoma de Hodgkin, a su vez, deriva de una célula del centro germinal, que al igual que los anteriores presenta una hipermutación somática de las inmunoglobulinas y por último los linfomas asociados a mucosas (MALT) y los linfomas de la zona marginal, se originan de las células B de memoria de la zona marginal del ganglio linfático. Mientras que las neoplasias de células plasmáticas tendrían su origen de manera post germinal (Meledo y Mate 2015).

Las neoplasias de células linfoides pueden tener una presentación clínica en forma de leucemia o de linfoma (afectando el ganglio linfático o de manera extra ganglionar). La OMS en su clasificación del 2008 dividió las neoplasias linfoides en neoplasias de células linfoides precursoras, neoplasias de linfocitos maduros B, T o NK, linfoma de Hodgkin y enfermedades linfoproliferativas asociados a inmunodeficiencias. (Meledo y Mate 2015)

En México en el año 2012, se registraron la presencia de 147,985 tumores malignos, que correspondieron a una tasa de incidencia de 131.5/100 000. De los cuales los tumores más frecuentes fueron el cáncer de mama, próstata, cérvix y ubicado en la décima posición por frecuencia los Linfomas No Hodgkin (LNH) con 4632 muertes en ese año. (Globocan) Los LNH se presentan con mayor frecuencia en adultos que en niños y tienen un incremento gradual con la edad, sobre todo a partir de la sexta década de la vida. La edad promedio en que se presentan los LNH es entre 45 y 55 años, presentando diferencias clínico-patológicas importantes con los LNH de la infancia. En niños la incidencia es rara y tiene un predominio extra-ganglionar, con mayor frecuencia se presenta con inmunofenotipo B, entre un 50 y 70%, con presentación agresiva y un porcentaje de curación elevado hasta en un 90%. En los adultos la incidencia es alta, de predominio ganglionar, entre 70% al 90% corresponde a un fenotipo B, el curso clínico es variable y el porcentaje de curación puede alcanzar hasta el 30%. (Romero et al, 2006).

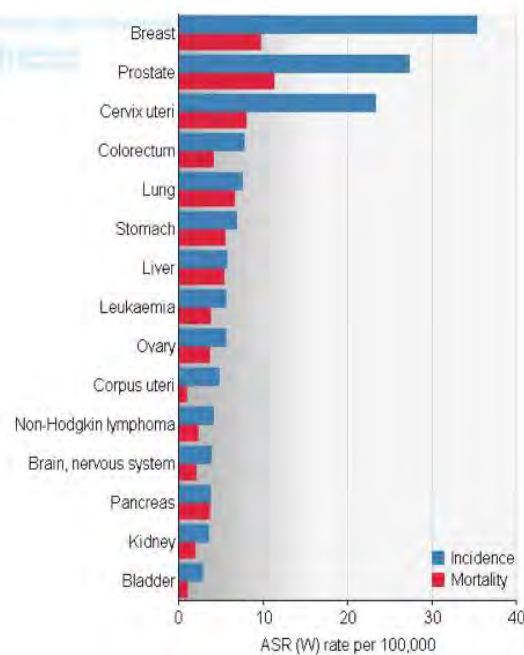


Figura 1. Incidencia y mortalidad de linfomas a nivel mundial en ambos sexos. (Tomado de International Agency for Research on Cancer)

Con base en el registro de Globocan (OMS) 2012, la tasa de incidencia mundial de LNH en hombres fue del 6.0/100 000 y la tasa de mortalidad 3.1/100 000, en las mujeres las tasas de incidencia y mortalidad mundiales fueron menores con respecto al hombre: 4.1/100 000 y 2.4/100 000 (Fig.1). Para México, los LNH con datos para hombres en incidencia y

mortalidad fueron 4.7/100 000 habitantes y 2.6/100 000 habitantes respectivamente y para el género femenino un poco menor su incidencia (3.5/100 000 habitantes) y mortalidad (2.0/100 000 habitantes) (International Agency for Research on Cancer).

Para poder realizar el diagnóstico debe obtenerse una biopsia excisional del tejido afectado por la neoplasia y revisada por un especialista en anatomía patológica. Las biopsias por aguja de corte suelen ser insuficientes, ya que en el 50% de los casos se ven limitadas en el material obtenido y las biopsias por aspiración de aguja fina únicamente sugieren el diagnóstico de neoplasia maligna, pero no son definitivas para su correcta clasificación. Es rigurosamente necesario realizar estudio de inmunohistoquímica, para la correcta clasificación de las neoplasias, por lo menos con los marcadores CD3 y CD20, que determinan si se trata de un linfoma de características fenotípicas “B” o “T” (Labardini et al, 2011).

Actualmente existe una clasificación que fue establecida en Francia en el año 2008, por la Organización Mundial de la Salud, para las neoplasias hematopoyéticas (Fig.2), entre ellas los Linfomas No Hodgkin como; 1) neoplasias de precursores linfoides, 2) neoplasia de células B maduras y 3) neoplasias de células maduras T y células Natural Killer. (Labardini et al, 2011). Dentro de las neoplasias de células B maduras existen 3 tipos de linfomas, que son de interés para el presente estudio, el Linfoma Difuso de Células Grandes B (LDCGB), Linfoma Burkitt (LB) y el Linfoma No Clasificable con Características Intermedias entre Linfoma Burkitt y Linfoma Difuso de Células Grandes B (BCUL), ya que se ha sugerido, que la presencia de múltiples anormalidades genéticas tiene implicaciones pronósticas en la sobre vida y en el número de recaídas del paciente.

Es importante mencionar que estas tres entidades tienen terapias y abordajes diferentes. Es de destacar la importancia de contar con una clasificación certificada o aceptada de manera mundial, lo cual se logró en el 2003 con la colaboración de la Asociación Europea de Hematopatología y la Sociedad Americana de Hematopatología, con múltiples actualizaciones, la última en 2008, la cual está basada en los principios de la REAL (Revised European – American Classification of Lymphoid Neoplasms), esta clasificación es

reconocida por las diferentes ramas de la medicina que intervienen el proceso de diagnóstico, pronóstico y tratamiento de la enfermedad. (Swerdlow et al 2008)



Figura 2. Clasificación de la Organización Mundial de la Salud para neoplasias linfoproliferativas. (Swerdlow et al 2008)

Un aspecto confuso de las neoplasias linfoides se refiere al uso de la terminología de leucemia y linfoma. El termino leucemia se usa para las neoplasias que se originan y afectan de manera extensa la medula ósea, produciendo generalmente alteraciones en sangre periférica. El termino linfoma se usa para las proliferaciones celulares neoplásicas originadas en tejido linfoide (ganglionar o extra ganglionar). Originalmente a estos términos se les consideraba de manera distinta, pero con el tiempo y un mayor conocimiento de la enfermedad, ambas divisiones se han difuminado.

Muchas entidades denominadas “Linfoma” pueden expresarse con presentaciones leucémicas y su evolución a una leucemia no es infrecuente durante la progresión de linfomas incurables. Y al contrario en ocasiones surgen tumores idénticos a las leucemias en forma de tumores en partes blandas y que no necesariamente se acompañen por

enfermedad en medula ósea. En consecuencia, los términos leucemia y linfoma se limitan a reflejar la distribución tisular habitual de cada enfermedad.

Dentro del extenso número de linfomas, el Linfoma Hodgkin (LH) se separa de todas las demás variantes, que constituyen el grupo de los linfomas No Hodgkin (LNH). (Kumar, Abbs & Aster 2014).

2.2 Linfoma Difuso de Células Grandes B

El Linfoma Difuso de Células Grandes B (LDCGB) se reconoce como la forma más frecuente de Linfoma No Hodgkin y presenta un ligero predominio en varones. A nivel mundial este tipo de linfoma constituye entre en 25 al 30% de los linfomas No Hodgkin que afectan a los adultos, con una mayor prevalencia en países industrializados. La edad media de presentación es en la séptima década de la vida, pero también puede ocurrir en pacientes jóvenes y con menos frecuencia en niños. La etiología es desconocida, puede ser secundario a la transformación de un linfoma menos agresivo (Linfoma Folicular, Leucemia Linfocítica Crónica / Linfoma de Linfocitos Pequeños, Linfoma de la Zona Marginal).

Las inmunodeficiencias son consideradas como factores predisponentes. Este linfoma puede surgir prácticamente en cualquier parte del cuerpo con presentación ganglionar o extra-ganglionar. Las presentaciones extra-ganglionares comprenden tubo digestivo, piel, hueso, cerebro, tejidos blandos, entre otros. La infiltración a medula ósea es relativamente infrecuente y aparece en etapas tardías de la enfermedad. Son considerados tumores agresivos y sin tratamiento son mortales, con quimioterapia los pacientes alcanzan una remisión completa del 50%. (Swerdlow et al., 2008)

Actualmente las terapias anti CD20 (Rituximab) parecen mejorar considerablemente tanto en la respuesta inicial como en el resultado global. (Kumar, Abbs & Aster 2014) En los cortes histológicos se presenta como una neoplasia de linfocitos con células que exceden el tamaño nuclear de un macrófago o más de dos veces el tamaño de un linfocito normal, con un patrón de crecimiento difuso, en mantos o laminas, el núcleo puede ser grande multilobulado, con nucléolos prominentes en ocasiones 2 o 3 por debajo de la membrana nuclear. Este tipo de linfomas generalmente expresan un inmunofenotipo CD19, CD20 positivo y una expresión variable de CD10, BCL6 y MUM1 (Swerdlow et al 2008).

Los linfomas Difusos de Células Grandes B (LDCGB) se dividen en dos grupos por su perfil de inmunohistoquímica; los de origen del centro germinal son positivos a CD10 y/o BCL6 y los de origen post centro germinal o células B activadas positivos a MUM1.

Según algunas investigaciones indican que los LDCGB de origen post germinal con sobre expresión de BCL2 y MUM1 presenta una disminución considerable en la supervivencia (Muris *et al.* 2006). Es importante recalcar que existen pocos estudios en LDCGB en población pediátrica, en el 2008 un estudio en niños demostró un mejor pronóstico y evolución a pesar de presentar un elevado índice de proliferación celular con Ki67 del 83%, expresión de proteína MYC del 84% y coexpresión de BCL2 del 28%, con un incremento en la frecuencia de la expresión de fenotipo de origen del centro germinal (CD10 y/o BCL6), por lo que al parecer los LDCGB en niños tienen un comportamiento menos agresivo a pesar de la coexpresión de diversas mutaciones. (Miles *et al.*, 2008)

2.2.1 Marcadores en el Linfoma Difuso de Células Grandes B

MYC. Las diferencias entre Linfoma tipo Burkitt y LDCGB no son claras, ya que se ha comprobado que algunos LDCGB presentan mutaciones en MYC (Humel *et al.*, 2006). Aunque en algunas ocasiones presentan morfología similar y por esta razón son casi indistinguibles, los perfiles de expresión genética son diferentes, por lo tanto, mientras el Linfoma Tipo Burkitt se caracteriza por su elevada expresión de mutaciones en MYC, el LDCGB presentara una expresión elevada de Factor de Histocompatibilidad Clase I y el Factor Nuclear Kappa / Beta. (Sandeep *et al.*, 2006). Las diferentes publicaciones reportan que entre el 5-15% de los pacientes con LDCGB presentaran dos o más mutaciones sincrónicas, generalmente MYC y BCL2, presentando un marcado predominio en varones, con una edad media de 55 años. (Le Gouill *et al.*, 2007; Kanungo *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2015)

BCL6. Es frecuente que los LDCGB presenten alteraciones en BCL6, la cual es una proteína transcripcional reguladora, que se encuentra en el centro germinal y promueve la formación de dichos centros germinales. En los LDCGB se encuentra alterada ya sea como consecuencia de la presencia de translocaciones en 3q27 o asociado a mutaciones adquiridas del gen promotor de BCL6 que anula la auto-regulación. Se ha propuesto que ambos tipos son secundarias a una acumulación de mutaciones somáticas que dan lugar a la sobre expresión de BCL6.

BCL2. Entre un 10-20% de estas neoplasias se asocia a la translocación (14;18) que conduce a la sobre expresión de BCL2, su papel como predictor en la sobre vida de los LDCGB es controversial, ya que existen reportes que los pacientes con linfomas originados en el centro germinal presentan translocación t(14:18) y los de origen post germinal (con peor evolución) no presentan dicha translocación, pero presentaron una frecuencia elevada en la amplificación del cromosoma 18q21 (Activación del Factor Nuclear Kappa / Beta) (Iqbal et al., 2006).

p53. Algunos estudios mencionan que cerca del 24% de los LDCGB son positivos para una expresión de MYC y p53, encontrando valores estadísticamente significativos donde presentaron una disminución directa en la sobrevida, por lo que p53 también podría considerarse un marcador pronóstico (Wang et al. 2016)

2.3 Linfoma Burkitt

En 1958 un cirujano británico llamado Dennis Burkitt describió por primera vez un tumor que afectaba los huesos de la cara y el abdomen de un niño en África. En un inicio fue clasificado como un sarcoma, posteriormente la enfermedad fue identificada como Linfoma no Hodgkin, con una característica en particular de ser altamente agresivo, llamándolo Linfoma de Burkitt. (Klapproth & Wirth, 2010). Este linfoma de comportamiento agresivo tiene diversas presentaciones clínicas y puede manifestarse tanto en ganglios (linfoma), tipo leucemia o extra-ganglionar, y como característica peculiar expresar la translocación del gen c-MYC. Actualmente se identifican tres variantes de la enfermedad; a) endémico; típicamente afecta niños en África y esencialmente todos están infectados de manera latente por el virus de Epstein Barr, que indicará que la infección precede a la transformación neoplásica, por lo que se demuestra la interacción del virus con la enfermedad.

Se desconoce a detalle la fisiopatología y la manera en que produce dicha transformación a linfoma, b) esporádico; la mayoría niños y adolescentes alrededor del mundo y c) asociados a inmunodeficiencia (VIH positivos), mostrando diferencias en la evolución, características clínicas y morfología. Histológicamente el tumor está compuesto por una proliferación de células neoplásicas, monótonas, cohesivas, de tamaño mediano, con finos gránulos en la cromatina, dispersos y un citoplasma basófilo, con presencia entre dos a cinco nucléolos y

con un alto índice de proliferación celular, con un típico patrón morfológico en cielo estrellado, debido a la presencia de numerosos cuerpos teñibles de los macrófagos. Se postula que la célula de origen es la célula B activada del centro germinal o post-centro germinal. (Swerdlow et al., 2008)

Los tumores asociados al Linfoma de Burkitt típicamente expresan marcadores B (CD19, CD20), muy frecuentemente CD10 y BCL6 y son uniformemente negativos para TdT (marcador de células linfoides inmaduras, que se expresa en neoplasia de precursores linfoides).

El alto índice de proliferación celular se puede hacer evidente con la expresión de Ki-67 en más del 90% de las células neoplásicas. (Swerdlow et al., 2008) Esta es una enfermedad muy agresiva pero muchas veces curable en las variantes endémicas y esporádicas. (Korac, Dotlic & Dominis 2012).

2.3.1 Marcadores en el Linfoma de Burkitt

MYC. El linfoma Burkitt es el primer ejemplo en el que se demostró que la alteración del gen MYC es responsable de la linfomagenesis (Klapproth & Wirth, 2010). La mutación de MYC es considerado un evento primario y se encontró una íntima asociación con la infección por el virus Epstein Barr. En 1982 se descubrió la presencia de la translocación de MYC situado en la región 8q24 con la translocación t(8;14) (q24;q32) causante de la enfermedad y que presenta yuxtaposición de la cadena pesada de la inmunoglobulina (IGH), en el cromosoma 14 o menos frecuente con la cadena ligera del cromosoma 22 (IGL), como resultado presenta una sobre expresión de la proteína MYC, que actúa directamente como un promotor de proliferación celular. (Klapproth & Wirth, 2010) (Dalla-Favera, 1982) (Sup-Park et al., 2005) (Le Gouill et al., 2007). Actualmente existen evidencias de que algunos linfomas tipo Burkitt no presentan la translocación de MYC, pero presentaban aumento en el número de copias del gen o también pueden presentar aumento de miRNAs (hsa-mir-34b). Los miRNAs son pequeños fragmentos de RNA que regulan la expresión de algunos genes a nivel post transcripcional, dichos fragmentos podrían ser el origen de la neoplasia en ausencia de mutaciones en MYC de los linfomas Burkitt (Thorley & Allday, 2008) (Leucci et al., 2008).

BCL2. Este marcador es usualmente negativo o raramente débil y positivo en una minoría de células neoplásicas. (Swerdlow et al., 2008)

BCL6. Algunos autores sugieren que la presencia de BCL6 en los linfomas tipo Burkitt presentan un mejor pronóstico, con una disminución en la mortalidad (Seegmiller et al, 2010)

p53. Los linfomas Burkitt también expresan mutaciones que inactivan p53, con lo cual aumenta la frecuencia de las translocaciones en los linfocitos B del centro germinal del ganglio. (Kumar, Abbs & Aster 2014)

2.4 Linfoma “B” no clasificable con características intermedias entre LDCGB y LB

En el 2008 la OMS introduce en la clasificación de linfoma, la categoría los Linfomas No Clasificables de Características Intermedias entre LB y LDCGB son linfomas B poco frecuentes con un comportamiento agresivo en los que hacer la diferencia es muy complejo. Entre sus factores pronósticos se incluyen mutaciones en MYC y BCL2 o la coexpresión de ambos. (Miyamoto et al., 2016). Es considerado un linfoma agresivo, que contiene características morfológicas tanto de Linfoma Difuso de Células Grandes B como de Linfoma Burkitt, pero por razones de comportamiento clínico no se incluye en esas categorías. La mayoría de estos casos presentan una histología con características intermedias, con células más pequeñas que las que se presentan en el LDCGB o más grandes que las que se observan en el Linfoma Burkitt, con un índice de proliferación elevado, en ocasiones con un patrón de cielo estrellado. (Swerdlow et al., 2008)

Algunos casos morfológicamente se asemejan más al Linfoma Burkitt pero difieren en el inmunofenotipo o en sus características genéticas. Este tipo de casos cuando presentan características morfológicas de Linfoma Difuso Células Grandes B demuestran alteraciones en MYC y cuando sus características morfológicas son de Linfoma Burkitt no presentan la alteración en MYC y muestran expresión de BCL2. Algunos linfomas foliculares que sufren transformación a Linfoma Difuso Células Grandes B y pueden entrar en esta categoría. (Swerdlow et al., 2008). En la actualidad parece que esta categoría tendera a desaparecer y será sustituida por el termino de: Linfomas de Alto Grado con Rearreglos en MYC, BCL2, y/o BCL6, ya que se considera que los criterios para Linfomas No Clasificables de

Características Intermedias entre LB y LDCGB son muy vagas, no se pueden aplicar de manera uniforme y su utilidad es limitada como categoría diagnóstica. (Swerdlow et al., 2016)

2.5 Linfomas Doble Hit / Linfomas de Alto Grado

A partir del año 2010 comienza a utilizarse el término “Linfoma Doble Hit”, el cual aplica a un grupo de tumores que se caracteriza por presentar translocaciones sincrónicas en MYC, BCL2, y/o BCL6.

También se ha relacionado a la presencia de mutaciones en p53, asociándolo como factor de mal pronóstico. (Qing et al., 2016) (Wang et al., 2016). Algunos tumores únicamente presentan sobre expresión de la proteína, pero sin presentar la mutación y reciben el nombre de Doble expresor de Linfoma (DEL). Para poder clasificar como DEL es necesario una presencia mayor al 40% en la celularidad para MYC y más del 50% para BCL2. En la mayoría de los estudios la presencia de DEL tiene una evolución peor que la del LDCGB no específico, pero no es tan agresivo como los linfomas doble hit (Linfomas B de alto grado que presenta los re-arreglos en MYC, BCL2 y/o BCL6). (Swerdlow et al., 2016)

Los pacientes clasificados como linfomas Doble Hit / Linfomas de Alto Grado presentan un comportamiento clínico más agresivo, cariotipos complejos y un espectro de características patológicas que afectan LB, LDCGB y BCLU, que les confiere resistencia a las terapias convencionales y que requieren trasplante de medula ósea (Gustaaf et al., 2006) (Snuderl et al., 2010) (Jaffe & Pittaluga, 2011) (Shaoying et al., 2016). Se ha demostrado en diversos estudios que la sobre vida de los pacientes disminuye considerablemente, con una media de 6-8 meses, en los pacientes que presentan doble mutación con expresión sincrónica de MYC, BCL2, BCL6 y/o p53. (Farinha et al., 2006).

Las mutaciones en MYC generalmente son diagnosticadas por técnica citogenética de FISH, pero existen pruebas con marcadores por inmunohistoquímica en los que se encontró relación entre la tinción nuclear y citoplasmática con los paciente que presentaron mutaciones ya conocidas en MYC, es muy poca la información que se ha publicado sobre la interpretación de inmunohistoquímica, una de las limitantes encontradas es que solo detecta la expresión de la proteína de MYC y no el aumento en el número de copias (Tapia et al., 2011). En el año 2008, Niitsu *et al.*, realizaron un estudio sobre translocación MYC

y reporto que entre mayor sea el Índice pronóstico internacional (IPI) que presenten los pacientes, mayor será la frecuencia de encontrar alteraciones en MYC (Niitsu, Okamoto & Miura, 2008).

2.6 Índice pronóstico internacional (IPI)

El 1993 se determinó que ciertos criterios clínicos que podrían influir en el pronóstico y desenlace de los linfomas No Hodgkin, este conjunto de datos clínicos aún permanece vigente.

Los criterios son muy claros y son los siguientes; edad del paciente al momento del diagnóstico, niveles séricos de la Deshidrogenasa Láctica, afección de sitios extra ganglionares, estatus del paciente (desde asintomático a postrado en cama por la enfermedad), asimismo también estos criterios toman en cuenta la clasificación de Ann Arbor que clasifica al paciente según la localización de ganglios afectados a un solo lado del diafragma o de ambos lados. (Shipp et. al., 1993).

Tabla I. Diferencias y similitudes de los Linfomas de Células B Maduras de Alto Grado.

Característica	LDCGB	BCLU	LB
Morfología celular	Tamaño grande Multilobulada	Tamaño mediano	Tamaño mediano patrón es cielo estrellado
Proliferación (Ki67/MIB-1)	<90%	>90%	>90%
Expresión de BCL2	Poco frecuente	Poco frecuente	Generalmente negativo
Otros marcadores	CD19, CD120 BCL6 CD10 centro germinal MUM1postcentro germinal	CD19, CD20, CD33, CD10 BCL6 expresión variable	CD19, CD20, CD22, CD10, BACL6, IgM
Mutaciones en MYC	Raro	Frecuente	Presente 90% de casos
Alteraciones cromosómicas	No identificadas	MYC y BCL2 en el 50%	t(8;14) [80%] t(2;8) [15%] t(8;22)
Inactivación p53	ND	ND	Positiva

ND. No determinado de forma específica

Tabla II. Índice pronóstico internacional.

IPI	IPI ajustado a la edad
Edad > 60 años	Enfermedad avanzada (Ann Arbor) III o IV
Enfermedad avanzada (Ann Arbor) III o IV	DHL aumentada
Compromiso extraganglionar >1 sitio	Performance estatus ECOG >2
DHL aumentada	
Performance estatus ECOG >2	

Tabla III Clasificación Ann Arbor.

Estatus	Definición
0	Asintomático
1	Sintomático deambulando
2	Sintomático en cama <50% del día
3	Sintomático en cama >50% del día
4	Postrado

Tabla IV. Sobrevida y progresión de la enfermedad con respecto al IPI.

Grupo de riesgo	IPI estándar		
	Score IPI	Progresión libre de enfermedad a 4 años (%)	Sobrevida global a 4 años (%)
Bajo	0 ó 1	85	82
Bajo intermedio	2	80	81
Alto intermedio	3	57	49
Alto	4, 5	41	59

2.7 Mutaciones de interés

2.7.1 MYC

Es un factor de transcripción que controla la expresión de muchos genes: regulación del ciclo celular, metabolismo, reparación del ADN, respuesta al estrés, síntesis de proteínas y re-arreglos de micro RNA (miRNA) con su expresión. La expresión de MYC en la región del centro germinal es muy baja, en comparación con los linfocitos B de memoria, post-centro germinal. Esta baja expresión se cree podría proteger contra procesos de inestabilidad en el centro germinal del ganglio linfático. (Sietse et al., 2011). Además, es un regulador directo de ciertos genes que afectan la proliferación y crecimiento celular implicados en el control de una compleja red de microRNAs y mediadores apoptóticos.

Entre las funciones del gen MYC promueve la progresión G0/G1 a la fase S del ciclo celular, activando factores de regulación del ciclo celular (ciclina D1, CDK4 o E2F1) y la inhibición de inhibidores de quinasa dependientes de ciclina (Cyclin-dependent- kinase) como p21. En cuanto a los procesos de apoptosis el gen actúa estabilizando la proteína proapoptótica p53, y de forma indirecta, inhibe proteínas antiapoptóticas como BCL2. Respecto a la diferenciación celular se observó que la regulación negativa de MYC permite la salida del ciclo celular y su posterior diferenciación (Tapia & Mate 2015).

La transformación maligna de MYC fue identificada en un inicio en líneas celulares de modelos animales transgénicos, de cualquier manera, se ha demostrado que por sí sola la mutación de MYC no es causa suficiente para producir linfomas, se han encontrado niveles muy bajos de la t(8;14) en individuos sanos, indicando que la presencia de la translocación *per se* no es causa suficiente para producir linfomas.

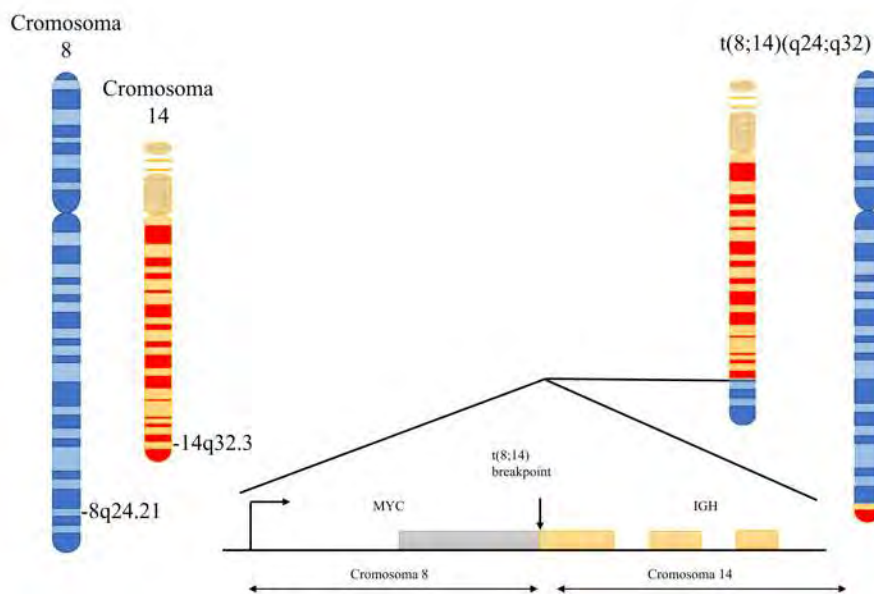


Figura 3. Esquema de la mutación de MYC t(8;14).

MYC es un factor de transcripción que forma heterodímeros relacionados con la proteína MAX que une las regiones promotoras y modula la expresión de ciertos genes con coactivadores y represores específicos. La activación transcripcional de MYC es mediada

por la unión de la histona acetil transferasa CBP/p300 y TIP60/gcn5 o por el factor de transcripción P_TEFb, entre otros.

Las funciones celulares que controla MYC incluyen: proliferación y crecimiento celular, replicación de DNA, biosíntesis de proteínas y la regulación del metabolismo. MYC promueve la transición de fase G 0/1 a la fase S, activando directa e indirectamente la expresión de CCND2 y CDKs y la regulación de algunos inhibidores del ciclo celular. La red transcripcional de MYC incluye la regulación directa de un gran número de miRs con funciones oncogénicas de supresión tumoral. El miR17-92 polycistron en 13q31 esta comúnmente amplificado en varios subtipos de linfomas y su función oncogénica esta mediada por una parte por regulación de PTEN, TP53 y E2F1, facilitando la activación de PI3K/AKT e inhibiendo la apoptosis respectivamente.

MYC inhibe múltiples miRs, con funciones de supresión tumoral, por reclutamiento de HDACs. Estos miRs tienen diferentes funciones, incluyen miR15a/16-1, miR26a, miR29, y miR34, que tiene la capacidad de inhibir neoplasias por medio de apoptosis (miR15/16-1 y miR34 actuando sobre BCL2 y TP53 respectivamente), funciones de proliferación (miR29 que actúa sobre CDK6), o de diferenciación celular (miR26a que actúa en EZH2). MYC no actúa uniéndose a genes silenciadores, por lo tanto, actúa como un activador de un programa de transcripción preexistente. Esta función de MYC nos puede ayudar a comprender el aumento en la agresividad de los tumores asociados a las alteraciones en MYC y pueden ofrecer una nueva perspectiva para terapias nuevas

Regulación de MYC en las Células del Centro Germinal

Es importante mencionar que en ciertas zonas del ganglio puede expresarse MYC en una pequeña subpoblación que se encuentra en la zona más clara en el centro germinal del folículo linfoide y que es considerada la de mayor proliferación celular. BCL6 es el regulador directo de MYC, esta relación está íntimamente asociada a la formación de la zona oscura del ganglio germinal y expansión de la proliferación de centroblastos. Además, MYC se vuelve a expresar un subconjunto de células activadas en la zona clara que son reguladas por NF-kB y la expresión de IRF4, donde BCL6 no participa, esta regulación de MYC es dependiente de la interacción con células T. En la zona clara donde se encuentran las células positivas para MYC corresponde a una subpoblación de células B

con alta afinidad para receptor de célula B (BCR), preparándose para entrar a la zona oscura, antes de proliferar, es en este punto donde se pueden promover diferentes mutaciones somáticas en IG, así perpetuar la reacción del centro germinal (CG). La molécula de BLIMP1 promueve la diferenciación y programación plasmática, reprimiendo la expresión de MYC y provocando la ausencia de MYC en la zona oscura. Estudios genéticos recientes donde se aislaron células de la zona oscura del centro germinal y células pertenecientes a la zona clara, por lo cual se identificaron diferentes factores transcripcionales.

TCF (E2A), es un potente factor de transcripción y que tiene una expresión elevada en la zona oscura del centro germinal, interesantemente este factor tiene una acción negativa en MYC inhibiendo ID3 (fig4). Aparentemente, estos elementos tienen autorregulación que controlan la transcripción entre las células de la zona oscura y las células de la zona clara. Controversialmente, la mayoría de los tumores se originan en células que no expresan proteína de MYC. Los eventos oncogénicos permiten que MYC abandone la regulación y efectos inhibitorios fisiológicos tanto de BCL6 en el centro germinal, como de BLIMP1 en la porción terminal de la diferenciación a células B (Ott, Rosenwald & Campo 2013).

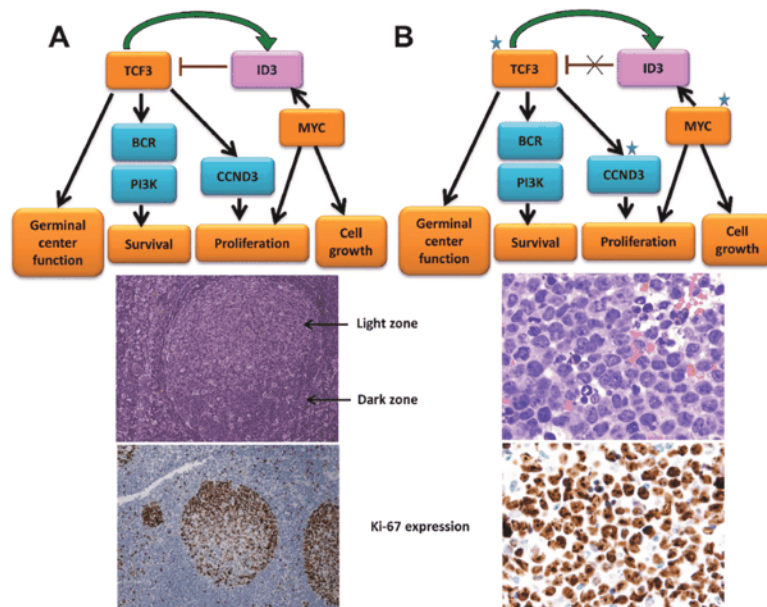


Figura 4. Acción de TCF3 sobre MYC. TCF3 realiza acción negativa en MYC inhibiendo ID3. A. TCF3 modula la proliferación de centros germinales, ayudando a la señalización de BCR y PI3K modulando la supervivencia celular. B. Linfoma Burkitt puede padecer diferentes mutaciones que actúan en la vía de TCF3 alterando MYC. (Tomado de Cai, Medeiros, XU, Young 2015)

2.7.2 BCL6

Es indispensable para la formación de centros germinales, considerado dedo de zinc, como factor de transcripción con un dominio BTB-POZ y N-terminal. Alrededor del 30% de los linfomas contienen varias translocaciones que tienen en común un breakpoint en el gen BCL6, localizado en el cromosoma 3q27, una posición muy lejana de los cromosomas. Fig.5 (SulimanBA, Xu D, Williams 2012)

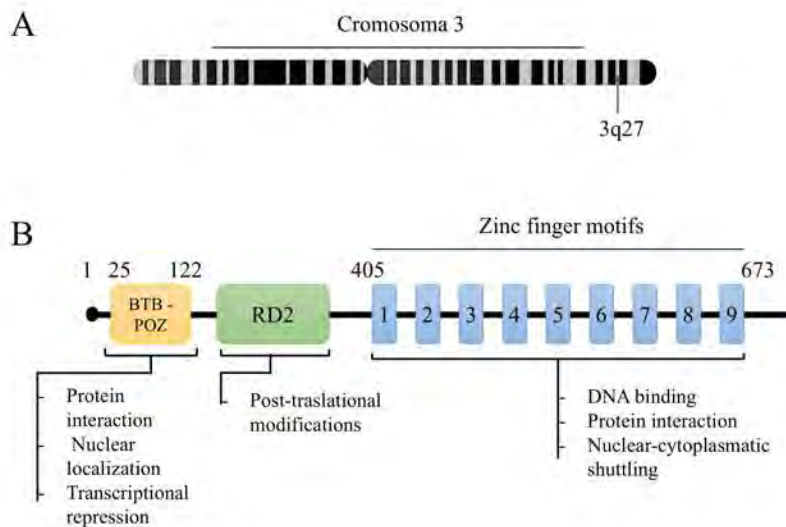


Figura 5. Esquema de BCL6. Localización cromosómica del gen BCL6 (A). Estructura de la proteína BCL6 expresada en dominios, se incluye el correspondiente al dedo de zinc, así como el dominio BTB-POZ (modificado de Suliman BA, Xu D, Williams 2012).

BCL6 se expresa débilmente en muchos tejidos, pero de manera muy marcada en las células B del centro germinal. Se demostró la importancia de BCL6 en la formación del centro germinal del ganglio, ya que en ausencia de este no se producen dichas estructuras, como se logró demostrar en un experimento con ratones que se produjo una deficiencia de BCL6. Es un factor importante como inhibidor de muchos factores que involucran la apoptosis, como son BCL2, TP53, IRF4 y BLIMP1.

En modelos animales como el ratón, se reprodujeron las alteraciones en la regulación de la expresión de BCL6, provocando enfermedades linfoproliferativas que semejaban a un linfoma difuso de células grandes B. Solo la mitad de las translocaciones que afectan BCL6, afectan de manera simultánea el locus IG. Las translocaciones en BCL6 se pueden encontrar

hasta en 30 a 40% en LDCGB, también algunos linfomas foliculares, hasta en los linfomas de la zona marginal. Otras de las cualidades que posee es silenciar o inactivar p53 “el guardián del genoma”. Esta actividad anti p53 inhibe la activación de mecanismos de reparación del ADN en los linfocitos B del centro germinal que sufren de la mutación somática. (Sietse et al., 2011).

2.7.3 BCL2

Fue descrito por primera vez en 1980 y se caracteriza por la t(14;18) en el linfoma folicular, se descubrió que tiene potentes funciones antiapoptóticas, regulado e inhibido por BCL6. Cuando ocurre la t(14;18) la transcripción de BCL2 se desregula con un alta actividad en la transcripción del alelo de BCL2 traslocado fig.6.

Aparentemente esta alteración es insuficiente para causar el linfoma folicular, dado que se demostró en ratones transgénicos que la presencia de la mutación por sí sola no genera linfomas. (Sietse et al., 2011). BCL2 está localizado en el gen 18q21, es un gen que codifica una proteína dentro de la membrana mitocondrial que actúa como guardián antiapoptótico. Existen dos isoformas de proteínas que difieren ligeramente, estas diferencias hacen que interactúen con proteínas Bad y Bak, sugiriendo que BCL2 tiene dos caminos para producir sus efectos antiapoptóticos. Esta misma translocación luego fue encontrada en el linfoma difuso de células grande B, linfoma cutáneo de la zona marginal, leucemia linfocítica crónica, linfoma esplénico de la zona marginal.

En todas estas entidades IGH/BCL2 son responsables por la expresión de la proteína BCL2. Se ha encontrado la presencia de esta alteración en individuos sanos, por lo que se piensa que es solo un paso de muchos para el desarrollo de linfomas. Por lo que la OMS ha recalado la importancia de una clasificación para linfomas que presenten el sincronismo de dos alteraciones genéticas o más. (Korac, Dotlic & Dominis, 2012)

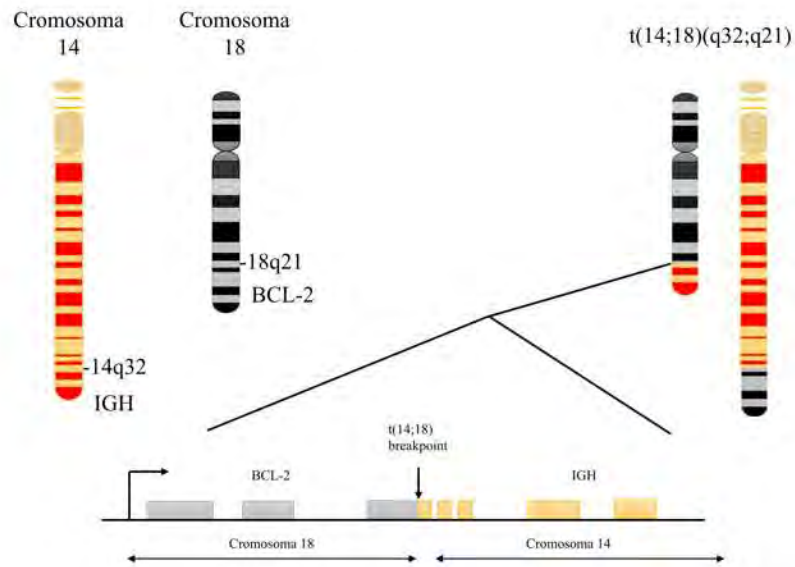


Figura 6. Esquema de la mutación en BCL2. (tomado de Disha Rathi 2017)

2.7.4 p53

Es un factor de transcripción inhibidor de crecimiento y favoreciendo apoptosis que responde a varios estímulos, entre ellos el daño al DNA, estrés y activación oncogénica. La inactivación de p53 o de su vía de señalización, es una característica frecuente en tumores humanos y se puede correlacionar con el incremento de malignidad, disminución en la sobrevida y resistencia al tratamiento (Martins, Brow-Sigart & Evan, 2006). Se ha observado que los linfomas Burkitt también expresan mutaciones que inactivan p53, con lo cual aumenta la frecuencia de las translocaciones en los linfocitos B del centro germinal del ganglio. (Kumar, Abbs, Aster 2014).

2.7.5 Ki67

Es considerado un marcador de proliferación celular, descrito por primera vez en 1983. Es una proteína nuclear, expresada en G1, S G2, no detectable me G0. MIB1 es el anticuerpo que se utiliza para demostrar la presencia de Ki67, actualmente es considerado un factor pronóstico en cáncer de mama, como biomarcador de la eficacia del tratamiento, midiendo el porcentaje de proliferación celular de las neoplasias, determinando un índice de crecimiento tumoral.

2.8 TRATAMIENTO

Linfoma Difuso de Células Grandes B

Según las guías de tratamiento publicadas por “National Comprehensive Cancer Network” en el Linfoma Difuso de Células Grandes B se debe aplicar como primera línea de tratamiento radioterapia más RCHOP (rituximab, ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, prednisona) puede ser de 3 a 6 ciclos dependiendo de las características clínicas. (Zelenetz et al, 2014)

Linfoma Burkitt

Algunos estudios mencionan que el uso de quimioterapia intensa combinada con Rituximab puede mejorar la sobre vida y el periodo libre de enfermedad, este tipo de neoplasias no responden a tratamiento con CHOP, el esquema que mejor resultados a presentado fue DA-EPOCH-R (Dosis Ajustadas de etoposido, prednisona, vincristina, ciclofosfamida, doxorubicina mas rituximab). La terapia presenta toxicidad elevada con mielosupresión y otras complicaciones. (Jacobson & LaCase 2014). También puede aplicarse RHyperCVAD (ciclofosfamida, vincristina, doxorubicina y dexametasona) alternando con dosis altas de metrotexate y citarabina mas rituximab (este régimen incluye terapia intratecal)

Linfoma no de clasificable de características intermedias entre LB y LDCGB

Para este tipo de linfoma el tratamiento recomendado es muy parecido al linfoma tipo Burkitt y se indica como primera línea DA-EPOCH-R con otras opciones como son RHyperCVAD y como última alternativa tenemos R_CODOX_M/R_IVAC (rituximab, ciclofosfamida, vincristina, doxorubicina con metrotexate/ifosfamida, etoposido y citarabina). La terapia con RCHOP ha sido asociada a una menor respuesta y mayor número de recaídas.

3. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad no se ha registrado ninguna bibliografía que identifique en México la presencia de mutaciones somáticas en pacientes adultos con los diagnósticos de Linfoma Burkitt (LB), Linfoma Difuso de Células Grandes B (LDCGB) y el Linfoma no clasificable con características intermedias entre Linfoma Burkitt y Linfoma Difuso de Células Grandes “B” (clasificación de la OMS 2008), que son considerados linfomas de células B maduras de alto grado. Este estudio busca demostrar una relación entre la supervivencia de los pacientes y el número de recaídas durante el tratamiento en pacientes que presenten diagnóstico de LB, LDCGB o Linfoma no clasificable con características intermedias entre LB y LDCGB, que presenten de manera sincrónica la sobre expresión de proteínas como BCL2, BCL6 y/o p53, y expresión de mutaciones en MYC para que se apliquen medidas terapéuticas adecuadas y más agresivas y en caso de demostrarse esta asociación con un mal pronóstico considerar cuidados paliativos, para no deteriorar la calidad de vida de los pacientes. La presencia de dicha mutación y la sobre expresión de proteínas, puede significar un parámetro importante para una futura clasificación molecular con dichas neoplasias, pudiendo traducirse en factores pronóstico y decisiones terapéuticas en beneficio de los pacientes.

4. HIPÓTESIS

La coexpresión de p53, BCL2, BCL6 y Ki67 en las células neoplásicas confiere resistencia a los tratamientos convencionales en pacientes IMSS con diagnóstico de LDCGB, LB y UBCL.

5. OBJETIVO GENERAL

Demostrar la presencia en la sobre expresión de BCL2, BCL6, p53 y Ki67 como marcadores pronósticos directamente relacionados con la supervivencia de los pacientes con diagnóstico de linfomas de células “B” maduras de alto grado.

6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Generar una base de datos con los pacientes que cumplan con los criterios de inclusión.
2. Determinar la expresión de las proteínas de ki67, BCL-2, BCL-6 y/o p53 por inmunohistoquímica en células neoplásicas.
3. Estimar el valor pronóstico de la expresión sincrónica de ki67, p53, BCL2 y/o BCL6, evaluando el impacto en la sobre vida y el estado de salud actual en los pacientes seleccionados.
4. Realizar estudio comparativo del valor pronóstico del índice Pronóstico internacional (IPI) en relación con la expresión sincrónica de BCL2, BCL6, ki67 y p53

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 Tipo de estudio

Se realizó un estudio observacional, transversal, retrospectivo y comparativo.

7.2 Diseño del estudio

Estudio retrospectivo observacional, comparativo para investigar la asociación entre los marcadores pronósticos con la supervivencia y la respuesta a tratamiento

Para el estudio se formaron 3 grupos de pacientes: Grupo A (Linfoma Burkitt.); Grupo B (Linfoma Difuso de células grandes B) y Grupo C (Linfoma no Clasificable entre Linfoma Burkitt y Linfoma Difuso de Células grandes B)

7.3 Universo de trabajo

Para todos los grupos se recolectaron bloques de parafina y laminillas del archivo del departamento de patología del Hospital Regional #1 del IMSS en Charo, Michoacán.

7.4 Criterios de selección

Se incluyeron bloques de parafina y laminillas con:

- a) Diagnóstico previo de Linfoma de Alto grado (Linfoma Difuso de Células Grandes B, Linfoma Burkitt y Linfoma No Clasificable entre LB y LDCGB).
- b) Expedientes clínicos con los siguientes datos: edad, sexo, índice pronóstico internacional, tratamiento, periodo libre de enfermedad y en caso de presentar recaída a los cuantos meses de diagnóstico se presentó.

7.4 Criterios de no inclusión

- a) Linfoma Hodgkin
- b) Linfoma B considerados de bajo grado
- c) Linfomas T y de células Nk

7.6 Criterios de exclusión

Bloques de parafina no localizables o expediente clínico incompleto

7.7 Variables del estudio

Variables Independientes:

- a) Presencia de mutación en MYC
- b) Expresión de BCL2
- c) Expresión de BCL6
- d) Expresión de p53

Variables Dependientes:

- e) Respuesta a tratamiento y sobre vida
- f) Índice pronóstico internacional (IPI)

7.8 Periodo de Estudio

Bloques recibidos de 01 de enero del 2013 al 31 de diciembre del 2015.

Tabla V. Variables utilizadas en el estudio.

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Tipo de variable	Unidad de medida
Edad	Término que se utiliza para hacer mención del tiempo que ha vivido una persona	Cifra obtenida de la historia clínica expresada en años.	Cuantitativa Discreta	Años cumplidos
Sexo	Se refiere al término masculino o femenino, de la persona que participa en el estudio.	1: Masculino 2: Femenino	Categórica	Masculino o Femenino
IPI al momento del diagnóstico	Clasificación pronostica, que predice la evolución y duración de los linfomas, dividiéndolos en linfomas de bajo y alto grado	Riesgo bajo Riesgo bajo intermedio Riesgo alto intermedio Riesgo alto	Cualitativa ordinal	Estadio Ann Arbor Edad >60 Elevación DHL Dos o más sitios extraganglionares afectados
Clasificación Ann Arbor	Sistema de clasificación según los sitios que afecta el linfoma	Etapa I Etapa II Etapa III Etapa IV	Cualitativa ordinal	Afecta solo una región ganglionar Afecta de 2 o más regiones ganglionares Afecta de regiones ganglionares en ambos lados del diafragma Afecta diseminada de uno o más órganos extralinfáticos
Resultado Histopatológico	Con base en la morfología y reacciones antígeno-anticuerpo en estudio de inmunohistoquímica.	Linfoma Burkitt Linfoma no clasificable entre LB y LDCGB Linfoma Difuso de Células Grandes B CODOX-M/IVAC CVAD	Cualitativa Nominal	CD20, BCL2, BCL6, MUM1, Ki67
Esquema quimioterapi a	Tratamiento farmacológico y la respuesta.	DA-REPOCH IVAC REPOCH RHyper-CVAD CHOP RCHOP	Cualitativa nominal	Periodo libre de enfermedad supervivencia
Evolución del paciente a partir del diagnóstico hasta dos años	Revisar la evolución del paciente en el expediente clínico	Vivo con enfermedad Vivo sin enfermedad Muerto	Cualitativa nominal	Vivo con enfermedad Vivo sin enfermedad Muerto
Periodo libre de enfermedad	Término que se utiliza para hacer mención al tiempo que ha vivido una persona sin enfermedad después del tratamiento.	Cifra obtenida de la historia clínica expresada en meses.	Cuantitativa Discreta	Meses cumplidos

Ki67		Valoración al microscopio	Dicotómica	Positivo Negativo
BCL2	Es un factor con potentes funciones antiapoptóticas	Valoración al microscopio	Dicotómica	Positivo Negativo
BCL6	Importante como inhibidor de muchos factores que involucran la apoptosis factor de transcripción inhibidor de crecimiento y favoreciendo apoptosis que responde a varios estímulos	Valoración al microscopio	Dicotómica	Positivo Negativo
P53		Valoración al microscopio	Dicotómica	Positivo Negativo

7.9 Descripción operativa

Se solicitaron al Hospital Regional del IMSS de Charo el acceso a la base de datos del departamento del departamento de Hematología para localizar a los pacientes con diagnósticos de Linfoma Burkitt, Linfoma Difuso de Células Grandes B y Linfoma no clasificable con características intermedias entre Linfoma Burkitt y Linfoma Difuso de Células Grandes B.

Posteriormente se localizaron los expedientes de estos pacientes y se extraerán los siguientes datos:

- a) Sexo del paciente.
- b) Edad al momento del diagnóstico.
- c) Índice de IPI.
- d) Tiempo que presenta la enfermedad en meses desde el momento del diagnóstico.
- e) Evolución de la enfermedad.
- f) Tratamiento quimioterapéutico.
- g) Remisión o recaídas (número y tiempo).
- h) Diagnóstico histopatológico.
- i) Diagnóstico apoyado en el estudio de inmunohistoquímica.

Al tener el número total de biopsia se acudió al departamento de Anatomía Patológica del IMSS Hospital Regional #1 para solicitar los bloques que contuvieran el tejido donde se realizó el diagnóstico.

Se revisaron nuevamente las laminillas para corroborar diagnósticos y que coincidan con la patología descrita en los reportes histopatológicos.



Figura 7. Obtención de material biológico del bloque de parafina originalmente elaborado. De cada uno de los bloques se tomaron fragmentos representativos y se agruparon en un solo bloque, para realizar estudios complementarios.

Se realizaron marcadores por inmunohistoquímica de CD20, BCL2, BCL6, p53 y Ki67.

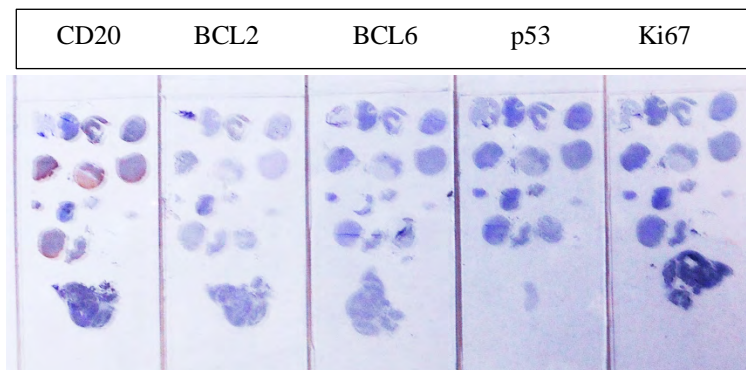


Figura 8. Ejemplos de laminillas de Inmunohistoquímica.

Una vez recopiladas estas laminillas se procedió a determinar mutación de MYC, se realizó con estudio de Hibridación in situ por fluorescencia (FISH, por siglas en inglés).

7.10 Inmunohistoquímica

La inmunohistoquímica es una técnica que combina la histología con la inmunología, basada en la determinación de antígenos celulares (su presencia y localización microanatómica) a través del reconocimiento antígeno-anticuerpo. Estos antígenos también son denominados

marcadores (Herrera-Arias y Díaz-Cardona, 2011). Esta técnica permite la realización de estudios retrospectivos para recuperar diagnósticos de enfermedad de interés epidemiológico con altos niveles de sensibilidad y especificidad (Jurado et al. 2012).

Para visualizar el lugar donde se produce la reacción antígeno-anticuerpo se emplea un marcador, en este caso, se realizó mediante técnicas inmunoenzimáticas indirectas utilizando una fase no inmunológica utilizando un complejo de avidina y un marcador enzimático con sitios de unión a ella (complejo avidina-biotina).

Para el proceso de inmunohistoquímica, se realizaron cortes tisulares de 2 μm , las cuales fueron colocados en laminillas de vidrio electrocargadas, desparafinadas a 70°C, posteriormente en xilol e hidratados por pasajes en concentraciones crecientes de alcohol. Se realizó una recuperación antigénica mediante calor, sometiendo las laminillas a 95 C durante 15 minutos.

Una vez que las laminillas se encuentran a temperatura ambiente, se realizó el bloqueo de la peroxidasa endógena con un reactivo para tal fin, con tiempo de reacción de 5 minutos. Posterior al bloqueo, se realizaron tres incubaciones, inicialmente con los anticuerpos primarios de interés (BCL2, BCL6, Ki67 y p53) durante 60 minutos, seguidos del anticuerpo secundario (anticuerpo biotinizado) durante 20 minutos y finalmente con el complejo avidina-biotina durante 20 minutos. La reacción fue revelada con Diaminobenzidina (DAB) exponiendo los tejidos durante 5 minutos. Una vez transcurrido este tiempo los tejidos fueron contracolorados con Hematoxilina de Harris durante 1 minuto, lavados con agua corriente, sumergidos en una solución de carbonato de litio durante 3 segundos y finalmente deshidratados y montados para su observación en el microscopio. Como control positivo se utilizó tejido linfoide, el cual se conoce que produce reacción positiva con los anticuerpos de elección, el cual fue valorado junto con los casos de estudio.

PROTOCOLO PARA LA REALIZACIÓN DE INMUNOHISTOQUÍMICA UTILIZANDO EL SISTEMA DE BIOTINA

1. Realizar cortes de los tejidos a 2 micrometros, utilizando laminillas inmunocargadas para montar los tejidos.
2. Desparafinar las laminillas en estufa a 60 °C durante 45 minutos.
3. Eliminar el exceso de parafina sumergiendo las laminillas en Xilol durante 5 minutos. Repetir dos veces.

4. Realizar la hidratación de los tejidos haciendo pasar las laminillas varias veces por alcoholes con concentraciones descendientes (100%, 96% y 70%).
5. Lavar con agua destilada.
6. Colocar las laminillas en solución de recuperación y realizar la recuperación de antígenos en autoclave u olla de presión eléctrica durante 10 minutos con la temperatura mas alta posible.
7. Permitir que las laminillas se enfríen, sin sacarlas de la solución de recuperación.
8. Una vez que las laminillas estén a temperatura ambiente, montarlas en el Rack para iniciar el procedimiento con anticuerpos.
9. Realizar la inhibición de la peroxidasa endógena con solución de peróxido de hidrógeno al 3%, colocando 3 gotas de reactivo, dejar actuar durante 5 minutos.
10. Lavar con agua destilada.
11. Colocar 100 uL de anticuerpo primario y dejar actuar durante 30 minutos.
12. Enjuagar con solución de lavado.
13. Aplicar 100 uL anticuerpo secundario-biotina y dejar actuar durante 10 minutos.
14. Enjuagar con solución de lavado.
15. Aplicar 100 uL anticuerpo terciario (HRP) y dejar actuar durante 10 minutos.
16. Enjuagar con solución de lavado.
17. Retirar las laminillas del Rack y colocarlas en una superficie plana.
18. Aplicar 100 uL de cromógeno (diaminobencidina) previamente diluido (una gota en 1 mL de diluyente), cuidando que quede bien distribuido por todo el tejido y dejar actuar durante 3 minutos.
19. Enjuagar con agua destilada.
20. Realizar el contraste sumergiendo las laminillas en Hematoxilina durante 30 segundos.
21. Enjuagar con agua.
22. Sumergir las laminillas en carbonato de litio tres veces.
23. Realizar la deshidratación de los tejidos haciendo pasar las laminillas varias veces por alcoholes con concentraciones crecientes (70%, 96% y 100%) y finalizar con xilol.
24. Montar con medio de montaje.

NOTA: el procedimiento se basa en el uso de los reactivos de la marca Cell Marque y utilizando el sistema de biotina. El procedimiento puede variar si se utilizan reactivos distintos o un sistema diferente (Merck KGaA, Cell Marque 2018)

7.11 Análisis estadístico

Se realizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para identificar la normalidad de los datos. Se utilizarán las medidas de tendencia central media \pm desviación estándar o mediana con rango intercuartílico para las variables continuas, mientras que para las variables categóricas se utilizaron frecuencias. Para estimar la asociación entre marcadores pronósticos de linfomas de alto grado (MYC, BCL2, BCL6, p53) con respuesta a tratamiento y supervivencia, se realizó Chi cuadrada. Se estimó el Riesgo Relativo para evaluar la magnitud de los marcadores pronósticos sobre la variable dependiente y se realizó estimador no paramétrico de la función de supervivencia Kaplan-Meier. Se consideró significancia estadística cuando $p < 0.05$.

7.12 Aspectos éticos

El código de Núremberg y la declaración de Helsinki regulan a la comunidad médica en lo relativo a los preceptos de ética en la investigación, donde el principio básico es el respeto por el individuo, su derecho a tomar decisiones una vez que se le ha informado claramente los riesgos y beneficios de su participación o no, en el estudio de investigación médica, el aceptar participar debe ser de manera libre, sin presiones de ninguna índole y con compromiso de que puede retirarse de la investigación cuando así lo decida. Otro precepto es que el bienestar del sujeto siempre debe estar por encima de los intereses de la ciencia y de la sociedad.

Debido a que la presente investigación contempla únicamente el uso de bases de datos, expedientes clínicos y revisión de laminillas del Hospital (INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL #1 CHARO), sin requerir la intervención de individuos en el estudio, por lo que es considerado de un riesgo mínimo, según lo estipulado en el reglamento de la ley general de salud en materia de investigación para la salud. Por este motivo y con base en el artículo 23 del reglamento antes mencionado, no se hace necesario el otorgamiento del consentimiento informado por parte de las pacientes incluidas en este estudio, aclarando que siempre se respetará el anonimato y no serán revelados los nombres de las pacientes.

En la presente investigación se tiene como propósito un bien social y la investigación se diseñó basándonos en resultados previos en otros países, nunca se realizará algún daño a las pacientes implicadas en el estudio, promoviendo un ambiente de investigación que proteja a todas las pacientes.

8. RESULTADOS

8.1 Descripción de la población de estudio

A partir de la aprobación del protocolo de investigación por parte de IMSS con número de registro F-2017-1602-21, se procedió a revisar los expedientes del Hospital General Regional No.1 Charo correspondientes a los casos reportados como linfomas en el periodo enero 2014 a diciembre 2016. En un censo de 98 casos del departamento de Hematología se identificó una población de 28 pacientes con expediente completo y bloques de parafina con tejido evaluable. Esta población fue clasificada de acuerdo con los criterios descritos en la sección de materiales y métodos (Tabla 6).

Tabla VI. Clasificación de la población de estudio.

Pacientes	Diagnóstico	Número de casos
Incluidos	Linfoma Burkitt	2
	LDCGB	13
	Linfoma No Clasificable	2
	Subtotal	17
Eliminados	Linfoma anaplásico	2
	LH	1
	Linfoma T periférico	1
	LLC	1
	Subtotal	5
Excluidos	No determinado	6
	Total	28

LDCGB. Linfoma de células grandes B; **LH.** Linfoma Hodgkin;

LLC. Leucemia Linfocítica Crónica/Linfoma de linfocitos pequeños

Los 17 casos incluidos en el estudio fueron caracterizados en función del género y del tipo de linfoma de acuerdo con la clasificación propuesta por la OMS (Fig. 10).

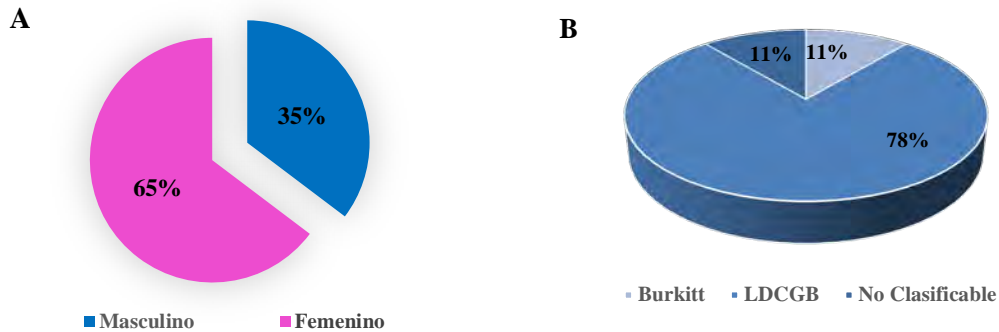


Figura 9. Distribución de la población de estudio por género (A) y tipo de linfoma (B).

8.2 Expresión de marcadores BCL2, BCL6 y p53 en los linfomas de alto grado.

Con el fin de evaluar la expresión de las proteínas de BCL2, BCL6 y p53 en la población de estudio, se seleccionó el tejido representativo de cada uno de los casos y se generó un macroarreglo en un nuevo bloque de parafina. Posteriormente se realizaron los cortes histológicos y se sometieron al análisis inmunohistoquímico como se describió en materiales y métodos (Fig. 12). Para el análisis inmunohistoquímico se selecciona el material biológico adecuado de acuerdo con su morfología y se ensayan los marcadores de estudio (Fig. 13).

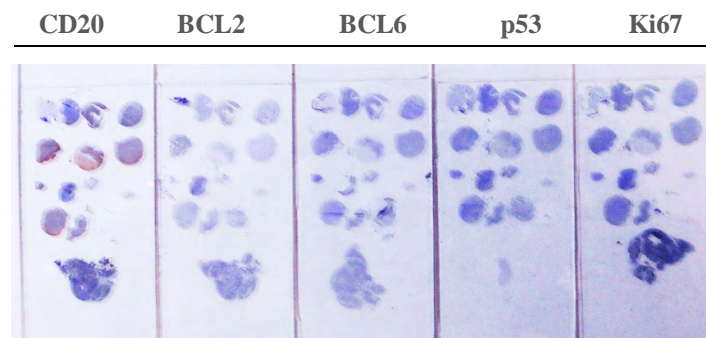


Figura 10. Macroarreglo de cortes histológicos para análisis inmunohistoquímico. A partir del tejido correspondiente a cada uno de los casos se dispusieron en un arreglo (macro), para el análisis de expresión de cada uno de los marcadores (BCL2, BCL6, p53 y Ki67) y un control para identificación de linfocitos B maduros (CD20)

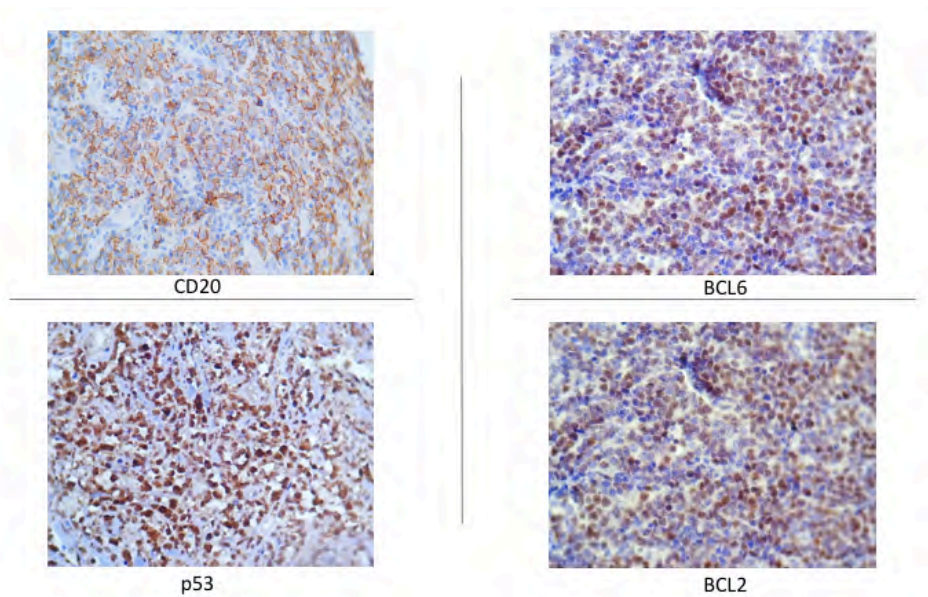


Figura 11. Fotomicrografía representativa de la expresión de los marcadores de estudio. Se muestra el resultado del proceso de inmunohistoquímica de los marcadores CD20, BCL6, p53 y BCL2 en un caso de linfoma de células B maduras de uno los casos seleccionados en el presente estudio.

Los casos clasificados como LDCGB presentaron la expresión de las tres proteínas, seis casos positivos para BCL2, tres para BCL6 y seis para p53. Uno solo de los casos identificado como Linfoma de Burkitt (LB) presentó la expresión de BCL2. Para el caso de la población de Linfoma no clasificable la expresión de los marcadores se presentó en dos casos para BCL2 y un solo caso para BCL6 y p53 (Fig. 13).

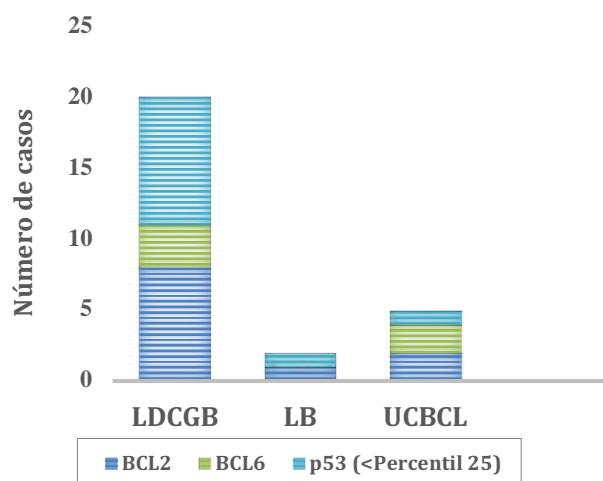


Figura 12. Prevalencia de la expresión de los marcadores BCL2, BCL6 y p53 en la población de estudio. Cada uno de los casos incluidos fue sometido a un análisis inmunohistoquímico, para el caso del marcador p53 se reporta el correspondiente al percentil 25.

8.3 Determinación del índice pronóstico internacional (IPI)

Con el fin de establecer la asociación del valor del IPI con la expresión los marcadores BCL2, BCL6, p53 y Myc se procedió a calcular este valor de acuerdo con lo establecido por Shipp *et. al* (1993). Cuatro de los 17 casos incluidos en el presente estudio dieron un valor correspondiente a la categoría de alto, 6 a la de intermedio alto, 3 a una categoría de intermedio bajo y 4 clasificados como bajo (Fig. 14)

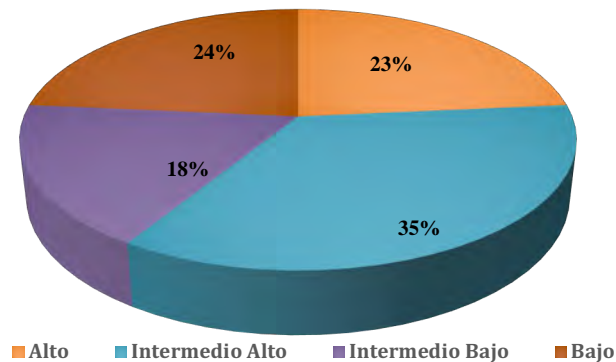


Figura 13. Clasificación de la población de estudio basado en el IPI. El índice pronóstico internacional (IPI) fue calculado para los casos incluidos en el estudio y su distribución corresponde a un valor alto, intermedio alto, intermedio bajo y bajo.

Los valores de IPI fueron asociados a cada de las entidades de estudio para ver su distribución (Fig. 15).

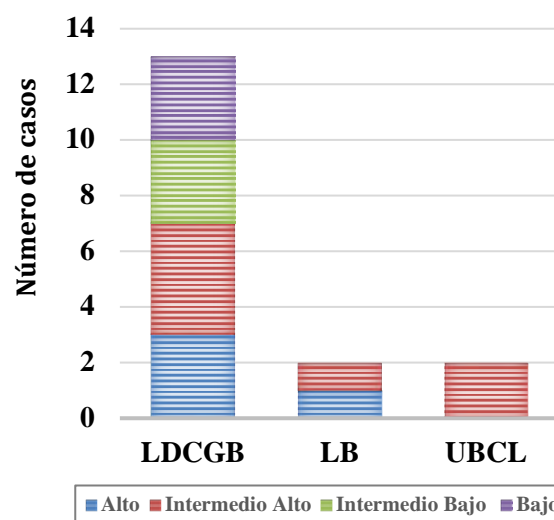


Figura 14. Asociación del IPI con el tipo de entidad analizada. Para cada uno de los casos incluidos en el estudio se calculó el valor IPI de acuerdo con lo establecido.

Para el caso del marcador p53 se estableció una escala porcentual de expresión para determinar su valor pronóstico. La escala comprende cuatro valores de acuerdo con el criterio del observador sobre el número de células neoplásicas que expresan p53 (Fig. 16).

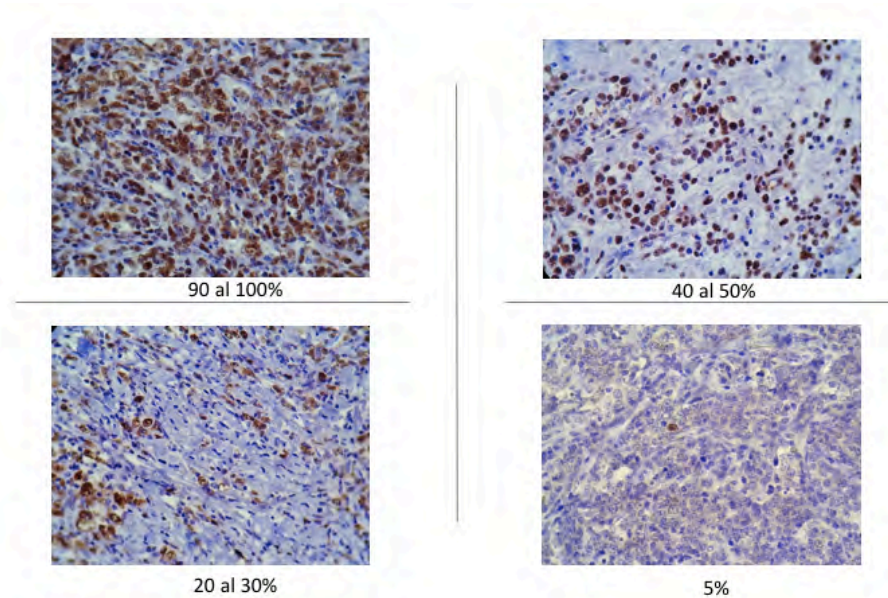


Figura 15. Fotomicrografía representativa de la expresión de p53. Se muestra el resultado del proceso de inmunohistoquímica del marcador p53 en un caso de linfoma de células B maduras de los casos seleccionados en el presente estudio donde se definen el criterio de expresión del mismo, percentiles 100, 50, 25 y 5.

La expresión de Ki67 por arriba del percentil 85 presentó una disminución importante en la sobrevida de los pacientes.

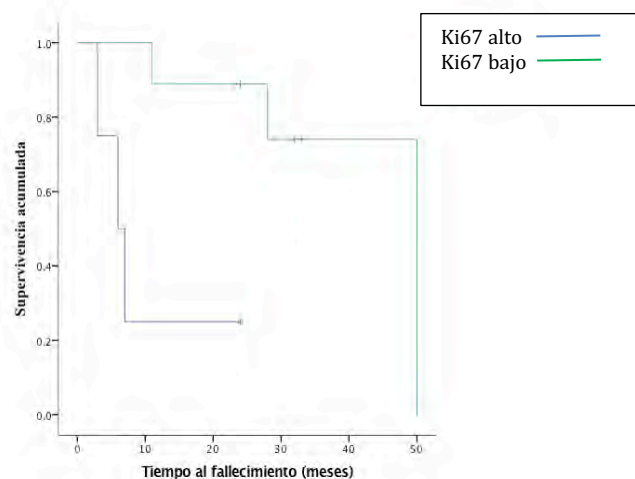


Figura 16. Expresión de Ki67. Aproximadamente el 70% los pacientes que presentaron expresión de Ki67 por arriba del percentil 85 falleciendo antes de los 10 meses de evolución de la enfermedad. $p=0.007$.

Se agruparon los pacientes reportando la coexpresión o ausencia de BCL2 y BCL6, como era de esperarse y por lo ya reportado en literatura, al presentar la coexpresión de estos marcadores se identificó un aumento significativo en la mortalidad.

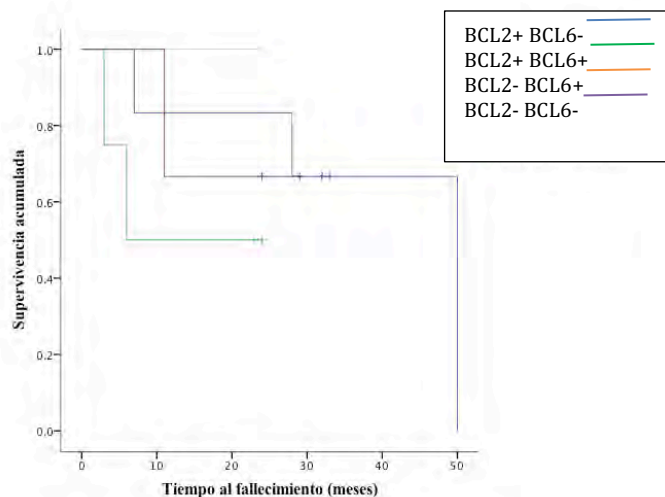


Figura 17. Sobrevida en pacientes con o sin expresión de BCL2 y BCL6.

En la figura 19 se muestra el efecto del valor de p53 en un percentil alto (más de 25) y bajo (menor a 25) con la sobrevida de los pacientes. $p=0.552$

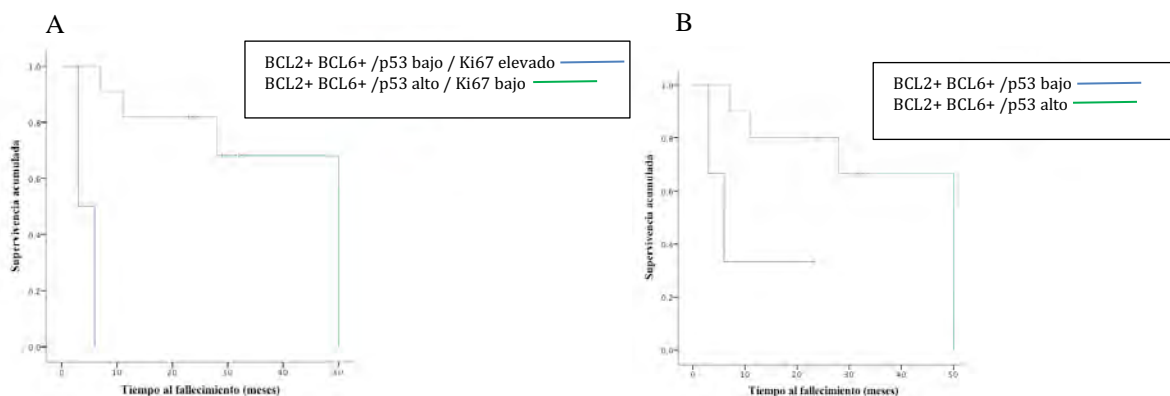


Figura 18. Sobrevida en pacientes con expresión de BCL2, BCL6, p53 y Ki67. Se compararon los casos que presentaban expresión de proteínas por debajo del percentil 25, siendo estos los que presentaron mayor mortalidad. Los pacientes con estas características reportaron una sobrevida menor a 10 meses. A) $p=0.0001$. B) $p=0.044$

9. DISCUSIÓN

Los linfomas de alto grado abarcan un espectro de varias neoplasias linfoides, identificándose diferentes características moleculares que proveen importancia en el comportamiento clínico, presentando alteraciones en los oncogenes principalmente MYC, BCL2 y BCL6. La incidencia para los Linfomas No Hodgkin ha sido evaluada desde 1940, modificándose constantemente a nivel mundial, pero desde hace 20 años y en la actualidad, solo ha sufrido ligeras modificaciones. A nivel mundial se reporta una mayor incidencia en hombres que en mujeres. En la literatura encontramos datos que sugieren que esta diferencia pudiera asociarse a la acción hormonal en las mujeres, efectuando un rol protector, haciendo hincapié en los beneficios protectores que sugiere en el embarazo para este tipo de linfomas (Nurit & Netanel, 2014).

A nivel mundial se ha reportado al Linfoma Difuso de Células Grandes B como el más frecuente de los Linfomas no Hodgkin, representando un 35-40% de todos los casos reportados en las diferentes regiones geográficas, actualmente este tipo de casos necesitan ser diagnosticados con base en su morfología (histología), un análisis inmunofenotipo, análisis cito genético (FISH) y con un diagnóstico a nivel molecular (Li, Young, Medeiros 2018).

El índice pronóstico internacional (IPI), fue desarrollado para los Linfomas No Hodgkin (LNH) agresivos y valido en todos los grados clínicos del LNH como predictor de respuesta a tratamiento (Prova, Singer, Baglin, Dokal 2010). Los linfomas difusos de células grandes "B" presentaron características clínicas de IPI alto, intermedio alto y bajo, los linfomas Burkitt y los linfomas no clasificables con características intermedias entre Burkitt y LDCGB expresaron características de IPI alto e intermedio alto.

Xie et al, en el año 2014 reportaron que la sobre expresión de p53 en 85 pacientes con diagnóstico de linfoma difuso de células grandes B, encontrando una fuerte asociación entre la expresión positiva de p53 con la disminución en la sobrevida de los pacientes, asociado a la expresión de la mutación de MYC, pero actuando como un factor independiente de BCL2. (Xie et al, 2014).

Oki et al reportaron en el 2014 que los linfomas doble hit con expresión de BCL2 y BCL6 presentaron un comportamiento clínico mas agresivo, por lo cual requerían terapia medicas mas agresivas (Oki et al 2014). Estos hallazgos coinciden con los reportados en la población analizada, ya que los pacientes que presentaron la coexpresion de BCL2 y BCL6 fallecieron en un periodo de tiempo menor, en comparación de los que no presentaron esta característica.

La expresión de Ki67, de tinción nuclear, se usa para determinar el índice de crecimiento tumoral. Algunos estudios identifican el rol y el significado de un índice de proliferación elevada con la expresión de Ki67, realizando estudio de inmunohistoquímica. Diversos autores sugieren que el significado de del índice de proliferación celular identificado por medio de Ki67 difiere dependiendo del tipo de linfoma. En algunas ocasiones pueden ayudar para identificar un linfoma con un comportamiento indolente y un linfoma con un comportamiento agresivo. El linfoma difuso de células grandes B, puede servir para identificar un paciente con buen o mal pronóstico, aunado a otros factores como el IPI (Broyde, Boyco, Streno 2009).

Más del 50% de todos los tumores presentan mutaciones que alteran o modifican la capacidad de p53 para detener el ciclo celular en G1. El daño al ADN activa ATM (serina cinasa) que a su vez fosforila a p53 aumentando su concentración, ya que el p53 está fosforilado activa la expresión del gen que codifica p21, el cual se une a complejos ciclina-CDK de G1, provocando que la célula detenga su ciclo en G1 y dando un tiempo para su reparación. Si la reparación es exitosa disminuyen las concentraciones de p53 y p21, permitiendo que la célula prosiga a "S". Cuando p53 se encuentra dañado o mutado puede replicarse, perpetuándolo, inhibiendo ciclina B y la topoisomerasa II necesarias para la transición a G2.

En condiciones de estrés ATM también fosforila y activa Chk2, una quinaasa que fosforila Cdc25A, la cual actúa deteniendo la célula en G1 (eliminando un fosfato inhibidor de CDK2) pre requisito para que las células comiencen "S". Así los niveles bajos de Cdc25A bloquean la programación hacia "S". Se ha demostrado que las mutaciones en ATM o Chk2 causan el mismo efecto que las mutaciones en p53.

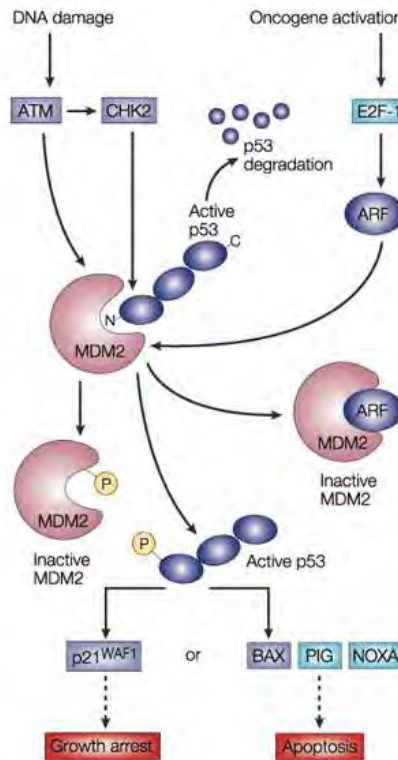


Figura 19. Vía de activación de p53 (tomado de Li-Fraumeny Syndrome pictures 2017)

Los niveles bajos de p53 son controlados Mdm2, esta molécula se une a p53, inhibiendo su capacidad activadora, degradándola por la adición de las moléculas de ubiquidina, la fosforilación de ATM a p53, creando un ciclo de realimentación autorregulatorio. Se ha reportado que los niveles elevados de Mdm2 producen una inhibición de Mdm2, pudiendo producir tumores, secundarios a reducción en la concentración de p53 y permitiendo el avance de la célula a G1.

10. CONCLUSIONES

- En el presente estudio se identificó una mayor incidencia del linfoma de alto grado en el género femenino de nuestra población, ya que el 65% de los pacientes eran mujeres. Este dato es distinto a lo reportado donde el género masculino resulta más afectado.
- La entidad denominada como Linfoma Difuso de Células Grandes B se identificó en el 70% de nuestros casos. Este resultado coincide con el reportado en la literatura.
- Los Linfoma Difuso de Células Grandes B presentaron características clínicas con un índice pronóstico internacional (IPI) alto, intermedio alto y bajo, los linfomas Burkitt junto con los linfomas no clasificables con características intermedias entre Burkitt y LDCGB expresaron características de IPI alto e intermedio alto.
- Los pacientes que presentaron expresión de p53 con un percentil menor a 25 tuvieron un franco aumento en la mortalidad, con una sobre vida menor a 10 meses.
- Los pacientes con la co-expresión de BCL2 y BCL6 fallecieron en un periodo de tiempo menor, en comparación de los que no presentaron esta expresión.
- El marcador de proliferación Ki-67, cuando su expresión en las células neoplásicas tuvo un valor equivalente a un percentil 85 o más fallecieron antes de cumplir 10 meses de evolución de la enfermedad.

11. PERSPECTIVAS

- Determinar si el gen que codifica para p53 presentará algún tipo de mutación en los casos con mayor índice de mortalidad.
- Establecer si existe alguna relación entre la mutación en ATM y la correcta expresión de p53.
- Identificar si la mutación y sobreexpresión de Mdm2 está ligada a una represión de p53.
- Determinar si la mutación en ATM y Chk2 tiene un efecto similar a mutaciones en el gen que codifica para p53.

12. BIBLIOGRAFÍA

Broyde A, Bycov O, Strenov Y, Okon E, Shpilberg O, Bairey O. (2009), Role and Prognostic significance of the Ki-67 index in non-Hodgkin's lymphoma, *American Journal Hematology*, Jun, 84(6): 338-43.

Cai Q, Medeiros JL, Xu X, Young KH, (2015), Myc-driven Aggressive B-cell Lymphomas: biology, entity, differential, diagnosis and clinical management, *Oncotarget*; 36: 38591 – 38616.

Dalla-Favera, Bregni M, Erikson, Patterson D, Gallo RC, Croce CM, (1982), Human c-myc onc gene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79: 7824-7827.

Dave S, Fu K, Wrigth G, Lam L, Kluin P, (2006), Molecular Diagnosis of Burkitt's Lymphoma, *The New England Journal of Medicine*, 354: 2431-2442.

Disha Rathi (2017), Introduction to Genetic Biomarkers, Lens before pens <http://lensbeforepens.com/genetic-biomarkers/>

Farinha P, Sehn P, Skinnider B, Wu Lin, Nancy Pattern, Sim Truong, Connors JM, Gascoyne RD, (2006), Strong p53 Expression is an independent predictor of outcome in de Novo Diffuse Large B-Cell Lymphoma (DLBCL) Treated with either CHOP or CHOP-R, *Blood*, 108: 812.

International Agency for Research on Cancer (2012), GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012, http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.

Humel M, Bentink S, Berger H, Klapper W, Wessendorf S, Barth T, (2006), A Biologic Definition of Burkitt's Lymphoma from Transcriptional and Genomic Profiling, *The New England Journal of Medicine*, 354: 2419-2430.

Herrera-Arias O, Díaz-Cardona J, (2011), Inmunohistoquímica en patología de mama. Diferenciación de lesiones complejas benignas y malignas de mama: un reporte de caso y revisión de la literatura. *Rev Colomb Obstet Ginecol* 62(3):267-271.

Iqbal J, Nepalli VT, Wright G, Dave BJ, Horsman DE, Rosenwald A, Lych J, Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, Gascoyne RD, Campo E, Ott G, Muller-Hermelink HK, Delabie J, Jaffe ES, Grogan TM, Connors JM, Vose JM, Armitage JO, Staudt LM, Chan WC (2006), BCL2 Expression Is a Prognosis Marker for The Activated B-Cell-Like Type of Diffuse Large B-Cell Lymphoma, *Journal of Clinical Oncology*, 24; (6): 961.

Jacobson C & LaCasce A, (2017), How I treat Burkitt Lymphoma in adults, *Blood*, 124: 2913-2920.

Jaffe ES & Pittaluga S, (2011), Aggressive B-cell lymphomas: a review of new and old entities in the WHO classification, *American Society of Hematology*. <http://asheducationbook.hematologylibrary.org/content/2011/1/506.full.pdf+html>

Jurado G, Montoya-Flórez L, Betancur C, Pedraza-Ordoñez F (2012). Uso de la inmunohistoquímica como herramienta epidemiológica para el diagnóstico de rabia bovina a partir de casos no conclusivos. *Rev. MVZ Córdoba* 17(2):3065-3070.

Kanungo A, Medeiros J, Abruzzo L, Lin P, (2006), Lymphoid neoplasms associated with concurrent t(14;18) and 8q24/c-MYC translocation generally have a poor prognosis, *Modern Pathology*, 19: 25-33.

Klapproth & Thomas Wirth, (2010), Advances in the understanding of MYC-induced Lymphomagenesis, *British Journal of Haematology*, 149: 484-497

Kumar, Abbs y Aster, (2014), Robins & Cotran Pathologic Basis of Disease, USA, Ed. Elsevier, 8 editions.

Labardini J, Cervera E, Corrales C, Balbuena M, Barbosa A, Espinoza J, López O, (2011), ONCOGUA EN LINFOMA NO HODGKIN, *Revista Cancerología*, 6: 139 – 152

Le Gouill S, Talmant P, Touzeau C, Moreau A, Garand R, (2007), The Clinical Presentation and prognosis of Diffuse Large B-Cell Lymphoma with t(14;18) y 8q24 / C-MYC Rearrangement, *Haematologica*, 92: 1335-1342.

Leucci E, Cocco M, Onnis A, De Falco G, van Cleef P, Bellan C, van Rijk A., Nyagol J, Byakika B, Lazzi S, Tosi P, Van Krieken H, Leoncini L, (2008), MYC translocation-negative classical Burkitt Lymphoma cases: an alternative pathogenetic mechanism involving miRNA deregulation, *The Journal of Pathology*, 216: 440-450.

Li S, Young KH, Medeiros LJ, (2018), Diffuse large B-Cell Lymphoma, *Pathology*; 50: 74-87.

Li-Fraumeni Syndrome pictures, (2017), <http://www.goldbamboo.com/pictures-t6914.html>.

Martins CP, Brown-Swigart L & Evan G, (2006), Modeling the Therapeutic Efficacy of p53 Restoration in Tumors, *Cell*, 127; 1323-1333.

Merck KGaA, Cell Marque 2018, <http://www.cellmarque.com/troubleshooting/>

Miles R, Raphael M, McCarthy K, Wotherspoon A, Lones MA, (2008), Pediatric diffuse large B-cell lymphoma demonstrates a high proliferation index, frequent c-MYC protein expression, and a high incidence of germinal center subtype: report of the French-American-British (FAB) international study group, *Pediatric Blood Cancer*, 51: 369-374.

Miyamoto K, Kobayashi Y, Maeshima AM, Taniguchi H, Nomoto J, Kitahara H, Fukuhara S, Munaata W, Mayamura D, Tobani K, (2016), Clinicopathological Prognostic factors of 24 patients with B-cell lymphoma, unclassifiable, features intermediate between diffuse large B-cell lymphoma and Burkitt lymphoma, *International Journal of Hematology*, 103: 693-702.

Muris, Mejeir, Vos, Krieken, Ossenkoppele, Oudejans, (2006), Immunohistochemical profiling based on BCL2, CD10 and MUM1 expression improves risk stratification in patients with primary nodal diffuse large B cell lymphoma, *The Journal of Pathology*, 208; 714-723.

Niitsu N, Okamoto M, Miura I, Hirano M, 2008, Clinical significance of 8q24/c-MYC translocation in diffuse large b cell lymphoma, *Cancer Science*, 100: 233-237.

Nurit Horesh & Netanel A. Horowitz, Does gender matter in Non-Hodgkin Lymphoma? Differences in Epidemiology, Clinical Behavior y Therapy, *Rambam Maimonides Medical Journal*, vol 5; 38.

Oki et al, (2014), Doble hit linfoma: The MD Anderson Cancer Center Clinical Experience, *British Journal of Hematology*, 166: 891-901.

Ott German, Rosenwald Andreas, Campos Elias, (2013), Understanding MYC-drive aggressive B-cell Lymphomas: pathogenesis and classification, *Journal Blood*, 122: 3884-3891.

Petra Korac, Snjezana Dotlic, Mara Dominis, (2012), Doble Hit Lymphoma or secondary MYC translocation Lymphoma? *Periodicum biologorum*, 114: 527-537.

Provan D, Singer Ch, Baglin T, Dokal I, (2010), Manual Oxford de Hematología Clínica, tercera edicion, editorial Aula Médica, pp: 184.

Qing Y, Xu-Monette ZY, Tzankov A, Deng L, Wang X, Manyam G, Visco C, Montes-Moreno, Zhang L, Dykaer K, Chiu A, Orazi A, Zu Y, Bhagat G, Richards K, His E, Choi W, van Krieken JH, Huh J, Ponzoni M, Ferreri A, Parsons B, Moller MB, Porors MA, Winter JN, Medeiros LJ, Hu S, Young K, (2016), Prognosis impact of concurrent MYC and BCL6 rearrangements and expression in de novo diffuse large B-cell lymphoma, *Oncotarget*, 19: 2401-2416.

Rodríguez R, Suescún G (2013). Aplicaciones e inconvenientes de la técnica Hibridación in situ Fluorescente (FISH) en la identificación de microorganismos. *Salud Uninorte* 29: 327-340.

Romero M, Hernández M, Duran M, (2006), Linfoma B difuso de células grandes. Características patológicas y de inmunofenotipo de pacientes estudiados en el Hospital General de México, *Revista Medica del Hospital General México*, 69: 192-198.

Shaoying L, Vivian L, Xuan J, Parth D, Shimin H, Cameron C, Guilin T, Nishita R, Medeiros J, Pei L, (2016), “High-grade B-cell Lymphoma with rearrangement and without BCL2 and BCL6 Rearrangements is associated with High p53 expression and a poor prognosis”, *American Journal of Surgical Pathology*, 40: 253-261.

Shipp, (1993), A predictive model for aggressive Non- Hodgkin Lymphoma, *The New England Journal of Medicine*, 322: 987-994.

Sietse MA, Siebert R, Schuurin Ed, van Imhoff GW, Kluin-Nelemans HC, Boerma EJ & Kluin M, (2011) Double-Hit B-Cell Lymphomas, *Journal Blood*, 117: 2319-2331.

Snuderl M, Kolman OK, Chen Y, Hsu J, Ackerman AM, Dal Cin P, Ferry JA, Harris NL, Hasserjian RP, Zukerberg LR, Abramson JS, Hochberg EP, Lee H, Lee A, Toomey CE, Sohani AR, (2010) B-cell Lymphomas with concurrent IGH-BCL2 and MYC rearrangements are aggressive neoplasms with clinical and pathologic features distinct from Burkitt Lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma, *American Journal Surgical Pathology*, 34: 327-340.

Sup-Park S, Su Kim J, Tessarollo L, Owens J, Peng L, Su Han S, Tae Chung S, Torrey TA, Cheung WC, Polakiewicz RD, Ried T, Mushinski JF, Morse HC, Janz S, (2005), Insertion of c-Myc into IgH induces B-Cell and plasma cell Neoplasms in mice, *Cancer Research*, 65: 1305-1315.

Suliman Bandar Ali, Dakang Xu, Brian Raymond George Williams, 2012, The promyelocytic leukemia zinc finger protein: two decades of molecular oncology, Frontiers in Oncology, vol 2, 74; 1-12.

Swerdlow S, Campos E, Lee Harris N, Jaffe E, (2008), WHO Classification of Tumors of Hematopoietic and Lymphoid Tissues”, Lyon, France, *World Health Organization*.

Seegmiller A, Garcia R, Huang R, Maleki A, Karandikar N, Chen W, (2010), Simple Karyotype and BCL6 expression predict a diagnosis of Burkitt Lymphoma and better survival in IG-MYC rearranged high-grade B-Cell Lymphomas, *Modern Pathology*, 23: 909-920.

Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, Advani R, Ghielmini M, Salles GA, Zelenetz AD, Jaffe E, (2016), The 2016 revision of the world Health Organization Classification of Lymphoid neoplasms, *Blood*, 127: 2375-2390.

Tapia G y Mate JL, (2015), Alteraciones del gen MYC en linfomas agresivos de células B: evaluación mediante FISH, relación de la expresión proteica y valor pronóstico, tesis doctoral, Universidad Autónoma de Barcelona.

Tapia G, Lopez R, Muñoz-Marmol AM, Mate J, Sanz C, Marginet R, Navarro JT, Ribera JM, Ariza A, (2011), Immunohistochemical detection of MYC gene status in aggressive B cell Lymphomas, *Histopathology*, 59: 672-678.

Thierry Soussi & Christophe Beroud, (2001), Assessing Tp53 status in human tumors to evaluate clinical outcome, *Nature Reviews Cancer*,1, 233-239.

Thorley-Lawson David A. & Allday Martin J., (2008), The curious case of the tumor virus: 50 years of Burkitt`s lymphoma, *Nature Reviews Microbiology*, 6: 913-924.

Van Imhoff G, Boerman E, Van der Holt B, Verdonck L, Kluin-Nelemans y Kluin P, (2016), Prognostic Impact of Germinal Center – Associated Proteins and Chromosomal

Breakpoints in Poor – Risk Diffuse Large B-Cell Lymphoma, *Journal of Clinical Oncology*, 25: 4135-4142.

Walter John, (2017), The Lymphoma Guide Information for Patients and caregivers, https://www.lls.org/sites/default/files/file_assets/lymphomaguide.pdf

Wang W, Hu S, Lu X, Young KH, Medeiros L, (2015), Triple-hit B-Cell Lymphoma with Myc, BCL2 y BCL6 translocation / rearrangement clinic pathologic features of 11 cases, *American Journal of Surgical Pathology*, 39: 1132.

Wang, Medeiros, Bueso-Ramos, Tang, Wang, Oki, Desai, Khuoury, Miranda, Tang, Reddy & Li, (2017) P53 expression correlates with poorer survival and augments the negative prognostic effect of MYC rearrangement, expression or concurrent MYC/BCL2 expression in Diffuse Large B-Cell Lymphoma, *Modern Pathology*, 30: 194-203.

Xie Y, Bulbul MA, Ji L, Inouye CM, Groshen SG, Tulpule A, O'Malley DP, Wang E, Siddiqi IN, (2014), p53 expression is a strong marker of inferior survival in de novo diffuse large B lymphoma and may have enhanced negative effect with Myc coexpression: single institutional clinicopathologic study, *American Journal Clinical pathology*; 141:593-604.

Zelenetz A, Gordon L, Abramson J, Advani R, (2014), NCCN GUIDELINES Version 4.2014 panel Members Non- Hodgkin´s Lymphomas, <https://www.nccn.org/about/nhl.pdf>