

## Departamento de Medicina / Universitat Autònoma de Barcelona

Autor: Dra. Silvana Novelli.

***TITULO: Tratamiento del Linfoma Difuso de Célula Grande B en la era Rituximab: Experiencia de un Centro.***

Palabras Clave: LDCG, LNH, Rituximab

Director del trabajo: Dr. Javier Briones

Codirector del trabajo: Dr. Jordi Sierra

Servicio de Hematología. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Barcelona

**Trabajo de Investigación: Retrospectivo descriptivo.**

**Curso 2010-2011. Convocatoria de junio.**

## INDICE

Resumen .....	pag 3.
Introducción .....	pag 4.
1.1 Definición .....	pag 4.
1.2 Epidemiología .....	pag 4.
1.3 Etiología y patogénesis .....	pag 5.
1.4 Manifestaciones Clínicas .....	pag 7.
1.5 Curso clínico y pronóstico .....	pag 8.
1.6 Tratamiento .....	pag 11.
Materiales y Métodos .....	pag 16.
Resultados .....	pag 18.
Discusión y conclusiones .....	pag 23.
Bibliografía .....	pag 25.

## RESUMEN

**Introducción:** El linfoma difuso de célula grande B (LDCG-B) supone el 40% de los linfomas no Hodgkin. El tratamiento consiste en esquemas de quimioterapia con antraciclinas combinados con Rituximab.

**Objetivos:** Analizar la supervivencia global (SG) y el tiempo libre de enfermedad (TLE) estratificados por distintas variables de interés en la era Rituximab. Además, se describen los resultados de los pacientes que recibieron un trasplante alogénico (aloTPH) desde antes de la era Rituximab hasta la fecha.

**Pacientes y métodos:** Se recogieron los datos de pacientes que recibieron quimioterapia asociada a Rituximab desde el 2003 hasta el 2010 (n= 128) y de los que recibieron un aloTPH independientemente de haber estado expuestos a Rituximab en el período 2001 – 2008 (n=13). Se analizó la SG y el TLE de los pacientes tratados con Rituximab, TASPE y aloTPH.

**Resultados:** La SG en los pacientes tratados con Rituximab fue del 59% y el TLE de 54%. La supervivencia estratificada por IPI fue de IPI bajo=82%, intermedio-bajo=54%, intermedio-alto=51%, alto=33%. En el TASPE la SG fue de 65% y con TLE 54%. La SG para los pacientes que recibieron un aloTPH fue de 49% a los 78 meses de mediana de seguimiento. Las causas de muerte de los alotrasplantados fueron: 56% EICH refractario, 22% enfermedad en recaída, 11% muerte súbita y 11% síndrome de obstrucción sinusoidal.

**Conclusiones:** Se confirman los datos publicados en los últimos años donde se observa una mejoría en la SG y el TLE en los pacientes que reciben Rituximab asociado a la quimioterapia. El trasplante alogénico es un tratamiento útil para rescatar a pacientes en recidiva tras un trasplante autólogo hemopoyético.

## RESUM

*Introducció: El Linfoma difús de cèl·lules grans B (LDCG-B) representa el 40% dels limfomes no Hodgkin. El tractament consisteix en esquemes de quimioteràpia amb antraciclins combinats amb Rituximab.*

*Objetivos: Analitzar la supervivència global (SG) i el temps lliure de malaltia (TLM) estratificats per diferents variables d'interès en l'era Rituximab. A més, es descriuen els resultats de pacients que han rebut trasplantat alogènic (aloTPH) fins l'actualitat.*

*Pacients i Mètodes: Es van recollir les dades de pacients que varen rebre quimioteràpia associada a Rituximab des del 2003 fins el 2010 (n=128) i dels que varen rebre aloTPH independent d'haver rebut Rituximab entre 2001 i 2008 (n=13). Es varen analitzar la SG i el TLM dels pacients tractats amb Rituximab, trasplant autòleg de precursors hematopoètics (TASPE) i aloTPH.*

*Resultats: la SG dels pacients tractats amb Rituximab va ser del 59% i el TLM del 54%. La supervivència estratificada segons l'IPI va ser del 82% d'IPI baix, 54% intermig-baix, 51% intermig-alt i 33% alt. En el TASPE la SG va ser del 65% i amb TLM del 54%. La SG dels pacients que varen rebre un alo-TPH va ser del 49% als 78 mesos de mitjana de seguiment. Les causes de mort dels alo-TPH varen ser: 56% EICH refractari, 22% recaiguda de la malaltia, 11% mort sobtada i 11% síndrome d'obstrucció sinusoidal*

*Conclusiones: es confirmen les dades publicades els últims anys on s'observa una milloria en la SG i en el TLM en pacients que reben Rituximab associat a quimioteràpia. L'aloTPH és un tractament útil per rescatar a pacients que han recaigut després d'un trasplant hematopoètic autòleg.*

## INTRODUCCIÓN

### 1.1. Definición

El Linfoma difuso de célula grande B (LDCG-B) es un grupo heterogéneo de linfomas agresivos de células B. Se ha postulado que la célula B normal de la que se originan es el centroblasto o inmunoblasto B. [1]

Los estudios moleculares, biológicos y clínicos han posibilitado la subdivisión del LDCG-B en variantes morfológicas, subgrupos moleculares e inmunofenotípicos y en distintas entidades patológicas. (Tabla 1) [2]

**Tabla 1: Linfoma Difuso de Célula Grande B: variantes, subgrupos y subtipos. (Tomado de la OMS)**

<p><b>1. Linfoma difuso de célula grande, <i>not otherwise specified</i> (NOS)</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>a. Variantes morfológicas comunes<ul style="list-style-type: none"><li>i. Centroblástico</li><li>ii. Inmunoblástico</li><li>iii. Anaplásico</li></ul></li><li>b. Variantes raras</li><li>c. Subgrupos Moleculares<ul style="list-style-type: none"><li>i. Tipo centro germinal (CG)</li><li>ii. Tipo célula B activada (CBA)</li></ul></li><li>d. Subgrupos inmunohistoquímicos<ul style="list-style-type: none"><li>i. LDCG-B CD5 positivos</li><li>ii. Tipo centro germinal (CG)</li><li>iii. Tipo No centro germinal (no CG)</li></ul></li></ul>
<p><b>2. Subtipos de linfoma difuso de célula grande</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>a. Linfoma B rico en células T/histiocitos</li><li>b. LDCG-B primario del sistema nervioso central</li><li>c. LDCG-B primario cutáneo, tipo <i>pierna</i></li><li>d. LDCG-B con virus de Epstein Barr positivo del anciano</li></ul>
<p><b>3. Otros linfomas B de células grandes</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>a. Primario mediastínico</li><li>b. LDCG-B intravascular</li><li>c. LDCG-B asociado a inflamación crónica</li><li>d. Granulomatosis linfomatoide</li><li>e. LDCG-B ALK positivos</li><li>f. Linfoma plasmablástico</li><li>g. LDCG-B que se origina a partir de la Enfermedad de Castlemann asociada a HHV8</li><li>h. Linfoma primario con efusión</li></ul>
<p><b>4. Casos limítrofes</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>a. Linfoma de células B, no clasificables, con características de LDCG-B y de linfoma de Burkitt</li><li>b. Linfoma de células B, no clasificables, con características de LDCG-B y de linfoma de Hodgkin clásico</li></ul>

El LDCG-B se puede originar *de novo* o puede provenir de un linfoma de bajo grado que se ha transformado, como un linfoma folicular o un linfoma de células pequeñas. [3, 4]

### 1.2. Epidemiología

El LDCG-B es el tipo histológico más común de los linfomas no-Hodgkin (LNH) y representa aproximadamente el 40%. [5] La incidencia del LDCG-B se ha visto incrementada en la segunda mitad del siglo XX en la mayoría de los países industrializados.

La edad de presentación más común se da en el adulto de mediana edad y en ancianos siendo 64 años la mediana al diagnóstico. Es más frecuente en varones y más común en la raza caucásica.

### 1.3. Etiología y patogénesis

La mayoría de los casos de LDCG-B no tienen una etiología clara. El virus del Epstein Barr está asociado con procesos linfoproliferativos post trasplante y a otros estados de inmunosupresión o al linfoma del sistema nervioso central. El virus herpes humano tipo 8 (HHV-8) está asociado con el linfoma primario con efusión.

Otros factores de riesgo para LNH incluyen historia personal y familiar de LNH, inmunosupresión primaria, trastornos autoinmunes, trasplante de órganos y exposición a toxinas de algunos pesticidas. [6]

El LDCG-B es una enfermedad heterogénea desde el punto de vista molecular en la que se han descrito múltiples traslocaciones cromosómicas y anomalías genéticas. La enfermedad se genera en las células B del centro germinal que han realizado la hipermutación somática en sus genes de la inmunoglobulina (Ig). El reordenamiento del gen *bcl-6* puede decirse que es específico del LDCG-B y se detecta en el 30 – 40% de los casos [7]. Aproximadamente el 40% de los pacientes inmunodeprimidos y el 20% de los pacientes VIH positivos presentan el reordenamiento del *bcl-6* en los LDCG-B que les afecta. [8-10]

El gen *bcl-6* se encuentra en la banda 3q27 y su traslocación produce un gen *bcl-6* truncado en su región 5'. Este proceso ocurre a través de traslocaciones recíprocas entre 3q27 y otros como 14q32 (IgH), 2p11 (Igκ) y 22q11 (Igλ). [11, 12].

La proteína del Bcl-6 media la unión específica de muchos factores de transcripción al ADN. También parece estar involucrada en la inducción de funciones asociadas al centro germinal (CG) dado que se expresa en linfocitos B del CG y no en las células plasmáticas. Por lo tanto, la regulación del *bcl-6* puede ser necesaria para la diferenciación terminal de la célula B a plasmática y a célula B de memoria. [13] Una mala regulación del *bcl-6* puede contribuir a la linfomagénesis al bloquearse la diferenciación terminal y generando resistencia a la apoptosis.

La BCL-2 es una proteína antiapoptótica que se localiza en la membrana interna de la mitocondria. Su sobre-expresión resulta de la traslocación del gen *bcl-2* localizado en el 18q21 con el gen de la *Ig*, localizado en 14q32. Aproximadamente el 30% de los LDCG-B tienen la traslocación t(14;18) (q32;q21). Esta traslocación hace que el gen *bcl-2* quede bajo control del elemento potenciador del gen de la cadena pesada de la *Ig*. El reordenamiento del gen *bcl-2* puede ocurrir en 2 situaciones en el LDCG-B: cuando el LDCG-B proviene de

un linfoma folicular transformado o un LDCG-B *de novo* con un patrón de expresión génica de centro germinal.

La proteína p53 es un factor de transcripción que induce la expresión de genes comprometidos en la apoptosis o parada del ciclo celular en respuesta a estímulos oncogénicos. La mutación del *p53* produce desregulación del ciclo celular, inestabilidad genómica y proliferación desmesurada de las células. La presencia de mutación del *p53* por sí sola se traduce en un mal pronóstico y en combinación con la mutación del *bcl-2* denota que el tumor proviene de un linfoma folicular transformado. [14]

Las mutaciones en la región variable de los genes de las Ig normalmente generan diversidad de anticuerpos en los linfocitos B del centro germinal. Sin embargo, las hiper-mutaciones somáticas aberrantes están presentes en un 50% de los LDCG-B. Estas alteraciones tienen como objetivo varios *loci*, incluyendo proto-oncogenes como *PIM1*, *MYC*, *Rho/TTF (ARHH)* y *PAX5*. [15].

El reordenamiento del gen *MYC* generado por la traslocación t(8; 14), ocurre en 5 a 15 % de los pacientes con LDCG-B. Esta traslocación (*MYC+*) define a un grupo pequeño de pacientes que no responden bien a la quimioterapia y tienen un riesgo elevado de compromiso del sistema nervioso central.

En resumen, la heterogeneidad de los LDCG-B es más que evidente si nos referimos al perfil de las células linfomatosas de pacientes. [16] Al menos 3 tipos de perfiles genéticos se han podido identificar; el más común, que ocurre en el 40% de los casos, es el asociado al reordenamiento del gen *bcl-6* en ausencia de otras alteraciones. El segundo tipo comprende la activación del *bcl-2*. [17] Los casos sin ninguna de las alteraciones previas conforman el tercer grupo. Estos subgrupos genéticos tenían una relevancia clínica en la era pre Rituximab ya que la presencia de *bcl-2* confiere un peor pronóstico [18] mientras que *bcl-6*, un mejor pronóstico [16, 19-21].

#### 1.4. Manifestaciones Clínicas

##### Síntomas y signos:

El LDCG-B aparece en los ganglios en la región central, axilar o en el abdomen. Típicamente los ganglios crecen de manera rápida o se presenta como una gran masa abdominal. Se acompaña de síntomas B (sudor, fiebre, pérdida de peso) en un 30% de los casos.

La presentación extranodal se observa en un 40% de los casos, siendo la región más afectada el tracto gastrointestinal. [22, 23] Otros sitios que pueden ser afectados incluyen los testículos, huesos, tiroides, glándulas salivales, piel, hígado, mama, cavidad nasal, senos paranasales y el sistema nervioso central.

##### Estadaje:

El estadaje está basado en el sistema de Ann Arbor (Tabla 2). Aproximadamente el 25% de los pacientes presentan enfermedad temprana localizada (Estadio I), otro 25% presenta el estadio II, mientras que el 45% presenta la enfermedad avanzada (Estadio IV).

La enfermedad con masa de más de 10 cm de diámetro (Bulky) comprende el 25% de los casos. El estadio IV se define por la presencia de afectación extranodal de más de 1 sitio. La afectación de la médula ósea se presenta en un 15% de los casos. [23] La diseminación en el sistema nervioso central (SNC) suele ocurrir más frecuentemente en un linfoma testicular o paranasal. [24] El IPI y el compromiso extranodal de más de 2 sitios son otros factores asociados a la afectación del SNC. [24] A los pacientes con alto riesgo de diseminación del SNC se les debe de examinar el líquido céfalo-raquídeo. Los pacientes con afectación del anillo de Waldeyer tienen riesgo incrementado de presentar afectación del SNC.

**Tabla 2. Sistema de estadaje de Ann Arbor**

Estadio I	Restringido a un área linfática
Estadio II	Dos o más áreas involucradas en un mismo lado del diafragma
Estadio III	Compromiso linfático de ambos lados del diafragma
Estadio IV	Afectación hepática, médula ósea o enfermedad extranodal extensa
Síntomas A	Ausencia de fiebre, sudoración o pérdida de peso.
Síntomas B	Presencia de fiebre, sudoración o pérdida de peso.
Sub-estadio E	Enfermedad extranodal localizada
Estadaje Clínico	Basado en la historia clínica, exploración física, laboratorio y pruebas de imagen
Estadaje Patológico	Basado en los resultados de la biopsias

Inmunofenotipo:

Las células malignas expresan en su superficie Ig monoclonal con cadenas ligeras  $\kappa$  o  $\lambda$ . La inmunoglobulina (Ig) más frecuentemente expresada es de tipo IgM. Con menor frecuencia se pueden encontrar células que no expresan Ig. [25] Las células linfomatosas generalmente expresan antígenos pan B, CD19, CD20, CD22, PAX5 y CD79a. También expresan CD45 y menos frecuentemente CD10 o CD5. [25, 26] Los LDCG-B que son CD5 positivos suelen ser más agresivos y tener un peor pronóstico aunque constituye menos de un 5% de los casos. [27] Las células del LDCG-B presentan reordenamiento de la región variable de la Ig y habitualmente presentan hipermutación somática. Las moléculas de adhesión con LFA-1 (CD16/CD18) y CD44 se expresan en el 50 – 75% de los casos. El CD44 se expresa en los LDCG-B muy agresivos y se asocian a enfermedad diseminada y a un pronóstico pobre. [28]

#### 1.5. Curso clínico y pronóstico

La supervivencia a los 5 años del LDCG-B está entre el 25 – 75%, dependiendo de los factores pronósticos presentes al diagnóstico. El tiempo libre de enfermedad (TLE) a los 5 años es de un 40%.

Se han descrito varios factores pronósticos en el LDCG:

##### Índice Pronóstico Internacional (IPI):

El International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project [29] estableció un índice clínico para predecir la supervivencia global (SG) que se ha convertido en el índice estándar en la práctica clínica para orientar las decisiones relativas al tratamiento y la selección de pacientes para ensayos clínicos. El IPI incluye cinco parámetros de pronóstico adverso clínico y de laboratorio, cada uno de los cuales se cuenta como uno si aparece en la puntuación de riesgo combinada:

1. Edad > 60 años
2. Dos o más áreas extraganglionares afectadas
3. Tumores en estadio III o IV, de acuerdo con el sistema de clasificación Ann Arbor
4. LDH > Límite superior de normalidad (LSN)
5. Estado funcional ECOG 2 o superior

En este sistema de puntuación se definen 4 grupos de riesgo diferentes:

- Enfermedad de riesgo bajo: IPI 0 o 1
- Enfermedad de riesgo intermedio-bajo: IPI 2
- Enfermedad de riesgo intermedio-alto: IPI 3
- Enfermedad de riesgo alto: IPI 4 o 5

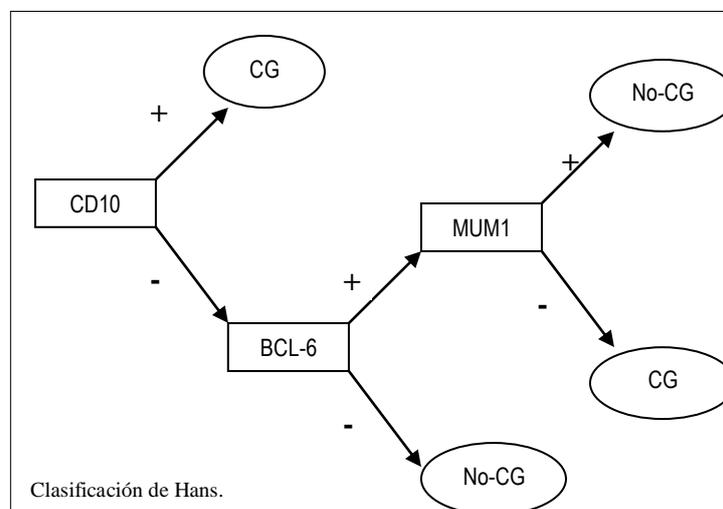
El IPI se puede utilizar para identificar a los pacientes con un riesgo más alto de recidiva que pueden ser candidatos a tratamiento más intensivo. En los pacientes de menos de 60 años, se utiliza en ocasiones el índice IPI ajustado por la edad (aaIPI), que reconoce el estadio del tumor, LDH y el estado funcional ECOG del paciente como parámetros para definir grupos pronósticos de forma similar al IPI.

Con este índice la supervivencia a los 5 años va desde 73% hasta 26% con IPI de 0 hasta 5 respectivamente.

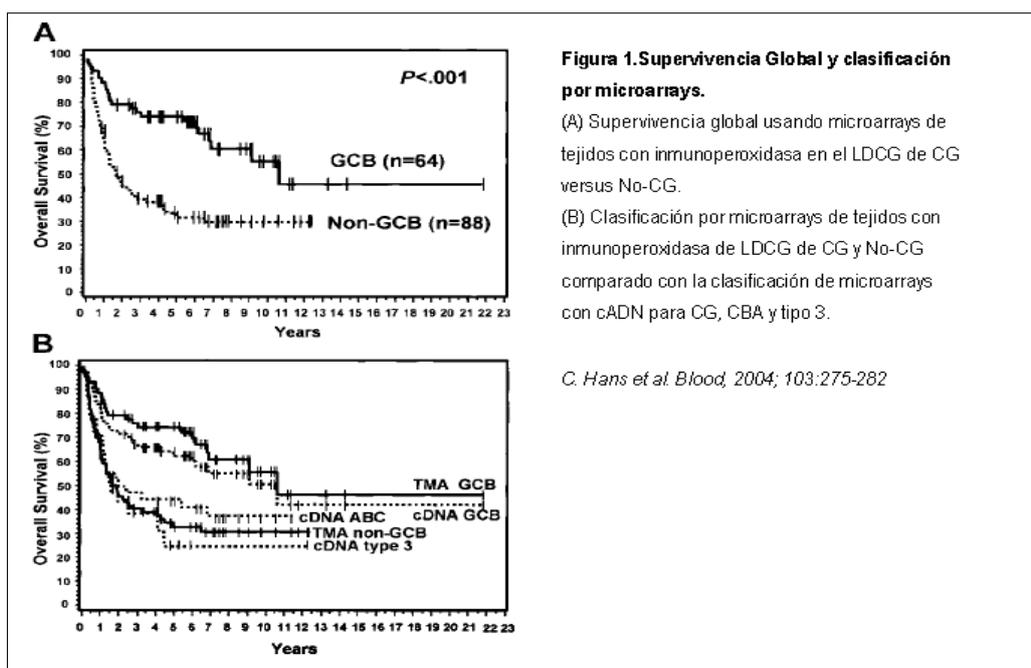
#### Perfiles de Expresión Génica:

El IPI, como mencionamos anteriormente, es útil para identificar a los pacientes con riesgo más alto de recidiva. Sin embargo, debajo de estos parámetros clínicos subyacen una mezcla de diferencias biológicas y genéticas.

Utilizando microarrays de tejidos con inmunoperoxidasas con anticuerpos frente a CD10, bcl-6 y MUM1 se ha desarrollado la siguiente clasificación con valor pronóstico [20, 21]:



A través del uso de microarrays de ADNc, el LDCG-B puede ser dividido en subgrupos con pronóstico diferente: un subgrupo de célula B de centro germinal (CG), otro de célula B activada (CBA) y un tercer grupo sin características específicas. El grupo del CG tiene una supervivencia significativamente mejor que los del la CBA. El tercer grupo es heterogéneo y no muy bien definido, pero tiene una evolución similar al grupo de CBA. Por ello, finalmente se utiliza la clasificación por microarrays en tejidos con inmunoperoxidasas que considera 2 grupos: CG y no-CG. Asimismo, se ha descrito otro sistemas de clasificación utilizando anticuerpos contra GCET1, CD10, BCL6, MUM1 y FOXP1 que lo único nuevo que aporta es una mejor clasificación pronóstica del LDCG-B mediastínico.[20, 21] (**Figura 1**).



#### Otros factores pronósticos:

Antes de la introducción del Rituximab a los esquemas quimioterapéuticos existían varios factores pronósticos bien descritos y que predecían una respuesta sub-óptima al tratamiento. Estos incluían el grado de diferenciación celular por perfiles de expresión génica, como hemos mencionado anteriormente, [20, 21], expresión del BCL2 [30, 31, 32] o FOXP1 [33, 34], y la desregulación de BCL6 [35], BCL2 [36] o PRDM1 [37, 38]. A pesar de ello, no hubo un consenso en utilizarlos como factores pronósticos en la práctica clínica y la introducción del Rituximab hizo que perdieran su valor pronóstico.

Por otro lado, el impacto de mal pronóstico del reordenamiento del *MYC* (*MYC-R*), se documentó muy bien en la era pre-Rituximab [39-48] y algunos trabajos confirman su valor pronóstico en la era Rituximab junto con el IPI y la edad del paciente. [49]

### Tomografía por emisión de positrones:

La tomografía por emisión de positrones (PET) se utiliza para valorar la respuesta post tratamiento. [50] El PET tiene una sensibilidad y especificidad del 72% y 100% respectivamente en detectar enfermedad residual en el LDCG-B. [51] Los criterios actuales [52] consideran una remisión completa incluso cuando se detecta una masa residual en el PET pero que no capta 18- fluoro-2-deoxi-glucosa (18-FDG), es decir, que pasó de ser FDG-PET positiva a FDG-PET negativa.

En general, una de las dificultades del uso del PET para valorar las respuestas tempranas es la falta de estandarización en los protocolos de imágenes. Los criterios actuales fueron diseñados para valorar respuesta a la finalización del tratamiento [52]. Se añade además que la definición de PET positivo es subjetiva. Por ello se decidió utilizar un sistema de puntuación basado en 5 puntos para la valoración del PET interino. [54] (tabla 3)

<b>Tabla 3. Escala de 5 puntos recomendada para el analisis del PET interino.</b>
1. No captación
2. Captación $\leq$ mediastino
3. Captación $>$ mediastino $\leq$ hígado
4. Captación moderadamente más elevada que la del hígado en cualquier sitio
5. Captación marcadamente elevada en cualquier sitio y en nuevos sitios.
<i>NG. Mikhaeel, M. Hutchings, PA. Fields, MJ. O'Doherty, AR. Timothy. FDG-PET after two to three cycles of chemotherapy predicts progression-free and overall survival in high-grade non-Hodgkin lymphoma. Ann Oncol 2005;16:1514– 1523.</i>

El análisis cuantitativo del valor estándar de captación (SUV) podría mejorar el valor pronóstico del PET [55]. Hay 3 estudios observacionales [56-58] que reúnen alrededor de 300 pacientes con LNH agresivos y que los resultados sugieren que la escala de valoración visual del PET interino puede identificar la respuesta temprana a la quimioterapia y predecir la evolución en el LDCG-B. Sin embargo, hasta no obtener los resultados definitivos de los estudios prospectivos a doble ciego en curso no se recomienda el uso del PET para valorar la respuesta temprana a la quimioterapia pero sí tiene valor al finalizar el tratamiento.

En la actualidad se están desarrollando nuevo trazadores, como el Fluoro – L – timidina, que incluso podrían facilitar imágenes para la evaluación de la enfermedad en el SNC. [59]

### 1.6 Tratamiento del linfoma difuso de célula grande.

En la actualidad, las decisiones relativas al tratamiento del LDCBG están basadas en el pronóstico del paciente, definido por el IPI. Los pacientes ancianos y los pacientes más jóvenes con enfermedad de riesgo bajo reciben normalmente inmunoquimioterapia estándar como

tratamiento inicial. En algunos centros, los pacientes más jóvenes con enfermedad de riesgo más alto (IPI  $\geq 2$ ) reciben regímenes de tratamiento más intensivos, incluyendo terapia a dosis altas (TDA) y trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos (TASPE).

#### Quimioterapia:

El régimen de quimioterapia de combinación CHOP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, prednisona) administrado cada 3 semanas (CHOP-21) en 6 a 8 ciclos de tratamiento, se consideraba desde hace más de 25 años el tratamiento estándar inicial para pacientes con LDCG-B [60]. Sin embargo, en la era pre – Rituximab, con este régimen CHOP-21 se conseguía la curación en tan sólo el 30-40 % de los pacientes. El estudio NHL-B2 [61], demostró que el régimen CHOP-14 administrado cada dos semanas era superior al régimen CHOP-21 estándar en ancianos: las tasas de supervivencia a 5 años eran del 43,8 % con CHOP-14 y del 32,5 % con CHOP-21, con una reducción del riesgo relativo de 0,66 ( $p = 0,003$ ). Las tasas de supervivencia global a cinco años eran del 53,3 % con CHOP-14 y del 40,6 % con CHOP-21, con una reducción del riesgo relativo de 0,58 ( $p < 0,001$ ). La toxicidad del tratamiento era similar en los grupos del estudio tratados con CHOP-21 y CHOP-14. Sin embargo, estos resultados no se pudieron confirmar en pacientes menores de 60 años. [62]

#### Rituximab y quimioterapia para el tratamiento del LDCG-B

Con la introducción del anticuerpo monoclonal anti-CD20 Rituximab en el tratamiento estándar ha mejorado significativamente la supervivencia global en pacientes con LDCG-B. Diversos estudios clínicos han demostrado el beneficio clínico que supone la adición de Rituximab a la quimioterapia de combinación estándar en pacientes jóvenes y ancianos con LDCBG.

#### Rituximab

El Rituximab es un anticuerpo monoclonal quimérico murino/humano, obtenido por ingeniería genética, que representa una inmunoglobulina glucosilada con las regiones constantes de la IgG1 humana y las secuencias de la región variable de las cadenas ligeras y cadenas pesadas murinas. Este anticuerpo se produce a partir de un cultivo en suspensión de células de mamífero (células de ovario de hámster chino) y se purifica mediante cromatografía de afinidad y de intercambio iónico, incluyendo procedimientos específicos de inactivación y de eliminación viral.

Rituximab se une específicamente al antígeno CD20, una fosfoproteína transmembrana no-glucosilada, expresada en los linfocitos pre-B y B maduros. El antígeno se expresa en más del 95 % de todos los linfomas no-Hodgkin (LNH) de células B.

El CD20 se expresa tanto en células B normales como en tumorales, pero no en células madre hematopoyéticas, células pro-B, células plasmáticas normales ni en otros tejidos normales. Este antígeno no se internaliza tras la unión del anticuerpo ni se elimina de la superficie celular. CD20

no circula en plasma como antígeno libre, y, por esta razón, no compite por la unión con los anticuerpos. En el LDCG-B el Rituximab debe usarse en combinación con quimioterapia CHOP en primera línea. La posología recomendada es de 375 mg/m<sup>2</sup> de superficie corporal el primer día de cada ciclo de quimioterapia, durante 6 - 8 ciclos, tras la perfusión intravenosa del componente glucocorticoide de CHOP.

El GELA (Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte) llevó a cabo el estudio LNH 98.5 en pacientes con LDCG-B no tratados previamente, de edades comprendidas entre 60 y 80 años. Los pacientes se randomizaron para recibir 8 ciclos de CHOP cada 3 semanas u 8 ciclos de CHOP más rituximab (R-CHOP) el día 1 de cada ciclo de tratamiento [63]. La adición de rituximab a CHOP mejoró significativamente el resultado clínico de los pacientes en comparación con el régimen CHOP solo: el índice de respuesta completa era del 76 % con R-CHOP en comparación con el alcanzado con CHOP, que era del 63 % ( $p = 0,005$ ) y las tasas de supervivencia global a 2 años eran del 70% con R-CHOP en comparación con el 57 % con CHOP. R-CHOP redujo significativamente el riesgo relativo de mortalidad en comparación con CHOP, con un hazard ratio de 0,64 ( $p = 0,007$ , IC 0,45-0,89). El beneficio de R-CHOP con respecto a CHOP se demostró tanto en los pacientes con enfermedad de riesgo bajo (es decir, índice aalPI 0 o 1) como en los que presentaban enfermedad de riesgo alto (es decir, índice aalPI 2 o 3). La superioridad de este esquema también se ha demostrado a los 5 años de seguimiento. [64] Por tanto, el R-CHOP es el tratamiento estándar en la primera línea de tratamiento en el LDCG-B.

En el estudio RICOVER-60 del DSHNHL (Deutsche Studiengruppe Hochmaligne Non-Hodgkin Lymphome; German High-Grade Non-Hodgkin's Lymphoma Study Group), también se confirmó el beneficio que supone la adición de Rituximab a un régimen CHOP-14 de dosis densificadas. [65] En el congreso americano de oncología (ASCO) del 2009, *D. Cunningham et al* publicaron los resultados de una estudio fase III donde se compara R-CHOP 14 + G-CSF y R-CHOP 21 para el tratamiento del LDCG-B en primera línea. No se encontraron diferencias en ambos esquemas. Por lo tanto, el tratamiento estándar es R-CHOP cada 21 días.

En el caso de pacientes más jóvenes con LNH agresivo de riesgo más alto ( $IPI \geq 2$ ), antes de la aparición del Rituximab, en un estudio randomizado en el que se utilizó quimioterapia CHOP estándar como comparador se evaluaron estrategias de tratamiento alternativas, utilizando intensificación y/o densificación de la dosis con objeto de mejorar el resultado clínico. Se investigó la eficacia clínica de la quimioterapia intensificada [66] (CEEP, MC, BEAM), seguida de trasplante autólogo de precursores hematopoyéticos (TASPE), en el entorno en primera línea en pacientes jóvenes con linfoma agresivo de riesgo bajo, intermedio-bajo e intermedio-alto, de acuerdo con el aalPI. Se observó una mejoría significativa de la supervivencia libre de eventos estimada a 5 años en los pacientes que recibieron quimioterapia a dosis altas y TASPE, en

comparación con los pacientes tratados con el régimen CHOP estándar. Estos datos sugieren el papel del TASPE en los pacientes que presentan, al menos, un factor de riesgo de acuerdo con el aalPI.

Estos datos están pendientes de ser confirmados en la era Rituximab aunque en el último Congreso Anual de la Sociedad Americana de Hematología *N. Schimtz et al* del DSHNHL presentaron los resultados de un ensayo prospectivo fase III en el que se compara quimioterapia agresiva tipo (R-CHOEP-14) en primera línea vs quimioterapia a dosis altas (R- MegaCHOEP) con TASPE en primera respuesta en pacientes jóvenes con IPI 2 – 3 y sorprendentemente, la supervivencia global (SG) a los 3 años fue superior en el grupo del R-CHOEP que en el R-MegaCHOEP (71% vs 56,7% respectivamente,  $p=0.05$ ). En la actualidad se están desarrollando 2 estudios randomizados en pacientes con LDCG-B tratados con R-CHOP 21 para analizar el papel de la intensificación del TASPE.

Se han realizado varios estudios que confirman que la adición del Rituximab a distintos esquemas como Mega-CHOEP, EPOCH, CHOP/ESHAP con densificación/intensificación de la dosis, mejoraba el resultado clínico. [67 – 70]

#### Trasplante de Progenitores Hematopoyéticos y Terapia de Rescate:

En los últimos años la adición del anticuerpo monoclonal anti - CD20 Rituximab a varios esquemas quimioterapéuticos mejoró las tasas de respuesta, con respuestas completas en un 75% a 80% de los casos. El uso de Rituximab en primera línea de tratamiento también mejoró la supervivencia libre de enfermedad (SLE) a los 5 años en pacientes mayores de 60 años de un 29% a un 47% [64] y también en pacientes adultos < 60 años con una SLE a los 3 años de 59% al 79% [71] y que también estuvo asociado a una mejoría en la supervivencia global.

Antes de la aparición del Rituximab, la supervivencia global (SG) a los 5 años para el LDCG-B en recaída era del 53% tras TASPE [72]. Se describieron varios parámetros que afectaban enormemente el resultado del TASPE que incluye: sensibilidad a la quimioterapia antes del TASPE [73], tiempo desde el diagnóstico a la recaída menor de 12 meses [74] y la presencia de factores pronósticos de la recaída como los descritos en el IPI secundario ajustado a la edad [75, 76]. La adición de Rituximab a una segunda línea de tratamiento seguido de un TASPE mejoró significativamente enfermedad libre de progresión (TLE) en los pacientes que no habían estado expuestos al Rituximab en su tratamiento de primera línea. [77] En un estudio reciente se han comparado 2 regímenes de rescate (R-ICE vs R-DHAP) sin observarse diferencias en el tiempo libre de enfermedad a los 3 años en ambos grupos, sin embargo, se pudieron sacar otras conclusiones importantes en la era Rituximab como que en los pacientes que presentan una recaída más allá de los 12 meses del diagnóstico, el hecho de haber recibido Rituximab no afecta a la supervivencia libre de eventos y que, pacientes que presentan recaídas tempranas

tras haber recibido un esquema con Rituximab en la primera línea tienen un pronóstico muy malo. [78]

El rol del trasplante alogénico de precursores hematopoyéticos en los LNH agresivos es incierto. Las ventajas teóricas del trasplante alogénico sobre el autólogo incluyen una fuente pura de progenitores hematopoyéticos libre de enfermedad y la posibilidad del efecto injerto contra el tumor. La mortalidad relacionada al trasplante (MRT) en los acondicionamientos mieloablativos (MRT 33% en el registro del EBMT) ha hecho que esta opción se vea limitada [79]. Los regímenes de acondicionamiento de intensidad reducida podrían ser la solución a este problema. Actualmente no hay evidencia de que exista efecto injerto vs LDCG-B, pero hay algunos reportes de casos con un TLE largo en pacientes quimiorrefractarios. [80]

## MATERIALES Y MÉTODOS:

Se recogieron los datos de todos los pacientes diagnosticados de un LDCG que se trataron con Rituximab dentro del esquema de quimioterapia desde el 2003 hasta el 2010 ( $n= 119$ .)

También se recolectaron los datos de pacientes de la era pre Rituximab ( $n=109$ ) en el período de 1988 al 2002. Asimismo, se ha recopilado información de los pacientes que recibieron un trasplante alogénico de precursores hematopoyéticos independientemente de haber estado expuestos a Rituximab en el período 2001 – 2008 ( $n=13$ ). En la tabla 4 A, B y C presentamos las características de nuestra población.

**Tabla 4 A:** Pacientes afectados de LDCG tratados con quimioterapia con Rituximab en primera línea.

**Tabla 4 B:** Paciente afectados de LDCG que recibieron un Trasplante Antólogo de Precursores Hematopoyéticos (TASPE).

**Tabla 4 C:** Pacientes afectados de LDCG que recibieron un trasplante alogénico de precursores hematopoyéticos independientemente de haber estado expuestos a Rituximab previamente.

Tabla 4 A

<b>Sexo</b>		
	Frecuencia	Porcentaje válido
Hombres	66	52
Mujeres	62	48
Total	128	
<b>IPI</b>		
	Frecuencia	Porcentaje válido
Bajo	35	30
Intermedio bajo	29	25
Intermedio alto	33	28
Alto	19	16
Total	116	
<b>LDH (U/L)</b>		
	Frecuencia	Porcentaje válido
Normal	57	46,7
Elevado	65	53,3
Total	122	100,0
<b>b2 microglobulina (mg/L)</b>		
	Frecuencia	Porcentaje válido
Normal	33	28,7
Elevado	82	71,3
Total	115	100,0
<b>Afectación Extranodal</b>		
	Frecuencia	Porcentaje válido
SI	58	46,8
NO	66	53,2
Total	124	100,0
<b>Localizaciones de la Afectación Extranodal</b>		
	Frecuencia	Porcentaje válido
ORL	15	24,6
Estómago	2	3,3
Intestino delgado	5	8,2
Intestino Grueso	2	3,3
Cutáneo	3	4,9
Otras	34	55,7
Total	61	100,0
<b>Masa bulky</b>		
	Frecuencia	Porcentaje válido
SI	35	30,4
NO	80	69,6
Total	115	100,0

**Tabla 4 A:** Pacientes afectados de LDCG tratados con quimioterapia con Rituximab en primera línea.

**Tabla 4 B:** Pacientes afectados de LDCG que recibieron un Trasplante Autólogo de Precursores Hematopoyéticos (TASPE).

**Tabla 4 C:** Pacientes afectados de LDCG que recibieron un trasplante alogénico de precursores hematopoyéticos independientemente de haber estado expuestos a Rituximab previamente.

Tabla 4A continuación

Estadísticos descriptivos					
	N	Mínimo	Máximo	Media	Desv. típ.
Edad	128	18,00	82,00	57,5234	15,27386
Albúmina g/L	101	18	151	39,52	12,866
Velocidad de sedimentación globular	98	1	132	42,48	32,249
Hemoglobina (g/L)	104	0	164	110,63	39,207
Recuento de leucocitos (x10e9/L)	104	2,01	38,00	8,1525	4,52667
Recuento de linfocitos (x10e9/L)	102	,00	4,00	1,4558	,77273

Tabla 4 B

Tipo de Respuesta pre Trasplante		
	Frecuencia	Porcentaje válido
Primera RC	4	16,7
Otra	19	79,2
En progresión	1	4,2
Total válido	24	100,0

Estadísticos descriptivos: TASPE					
	N	Mínimo	Máximo	Media	Desv. típ.
Edad	26	18,00	68,00	47,2692	13,45082

Tabla 4 C: Pacientes sometidos a un Alo TPH

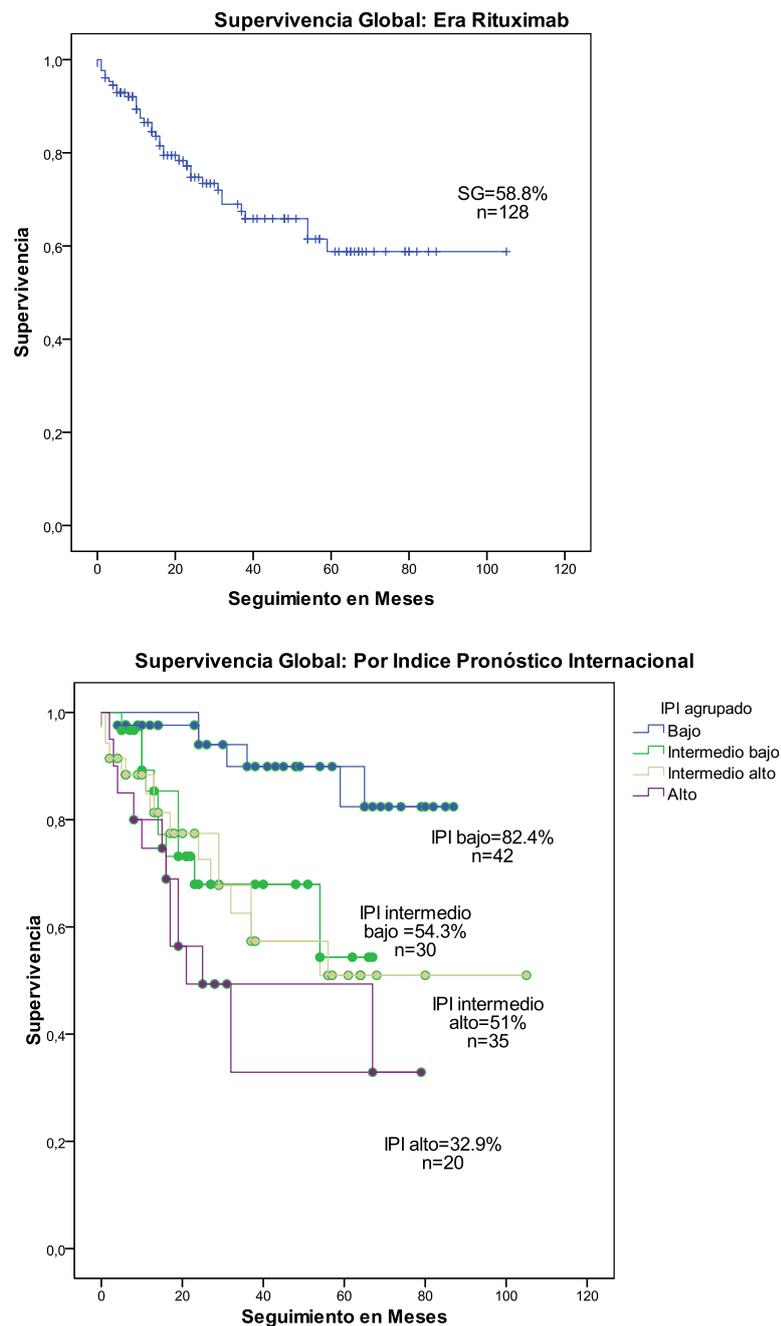
Edad en años		<i>(n = 13)</i>	
Media		42,8	
Mínimo		23	
Máximo		59	
Sexo		<i>n</i>	<i>%</i>
Hombres		9	69,2
Mujeres		4	30,8
Total		13	100,0
3		2	15,4
4		4	30,8
5		1	7,7
Total		13	100,0
Respuesta previa al TPH		<i>n</i>	<i>%</i>
Con enfermedad		1	7,7
Respuesta completa		9	69,2
Respuesta parcial		3	23,1
Total		13	100,0
Exposición a Rituximab		<i>n</i>	<i>%</i>
No		10	76,9
Sí		3	23,1
Total		13	100,0

## RESULTADOS:

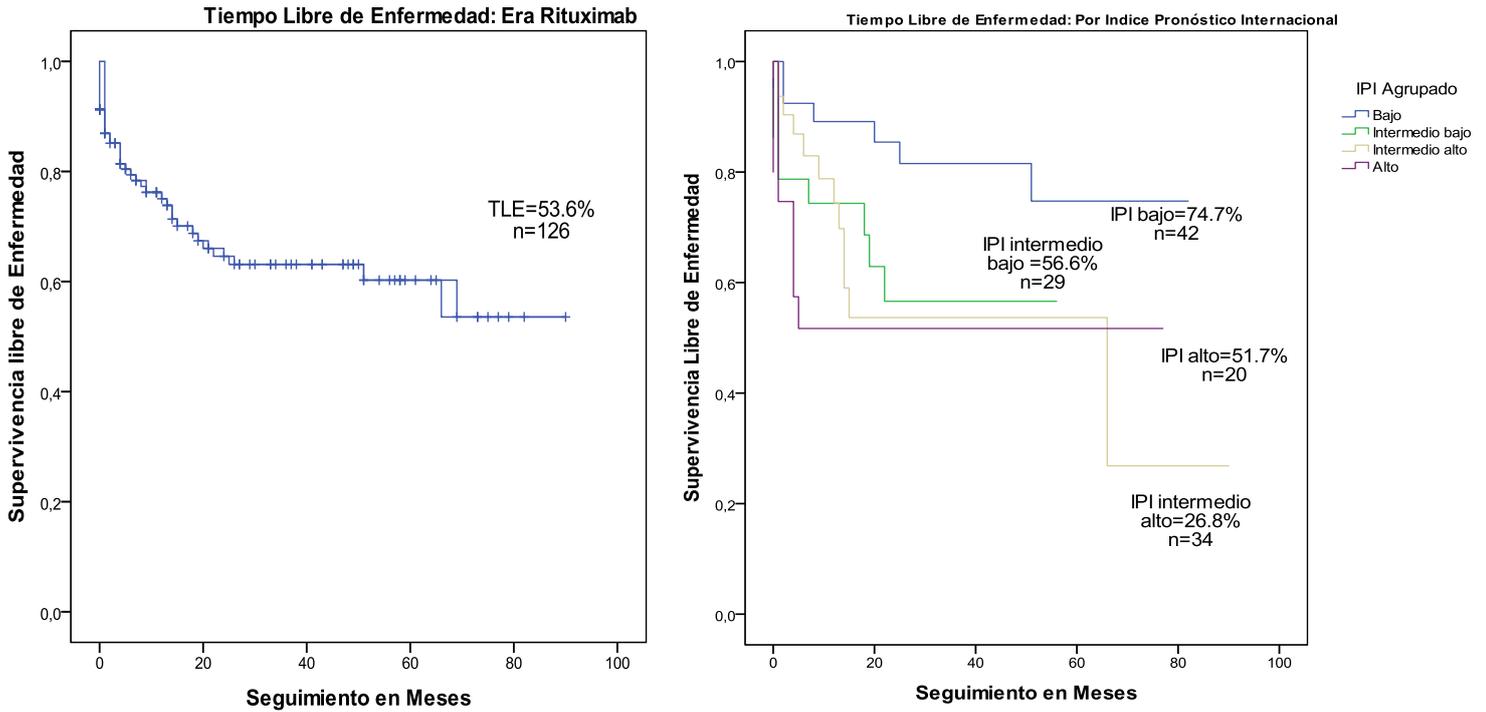
### Tratamiento con quimioterapia asociada a Rituximab en primera línea

La supervivencia global (SG) en los pacientes tratados con Rituximab en nuestro centro desde el 2003 hasta el 2010 (n=128) fue del 59% con tiempo libre de enfermedad (TLE) de 54% con una media de seguimiento de 72 meses (límite inferior 63 meses – límite superior 81 meses, DS 5 meses). La supervivencia estratificada por índice pronóstico internacional (IPI) fue de 82% para el IPI de bajo riesgo, 54% para el IPI de riesgo intermedio bajo, 51% para el IPI de riesgo intermedio alto y 33% para el riesgo alto ( $p=0.02$ ). El TLE fue de 75% para el IPI de bajo riesgo, de 57% para el IPI de riesgo intermedio bajo, de 27% para un IPI intermedio alto y de 52% para un IPI de riesgo alto ( $p < 0,05$ ). (Figuras 2 y 3)

**Figura 2: Supervivencia global y supervivencia estratificada por IPI en pacientes con LDCG tratados con quimioterapia asociada a Rituximab.**

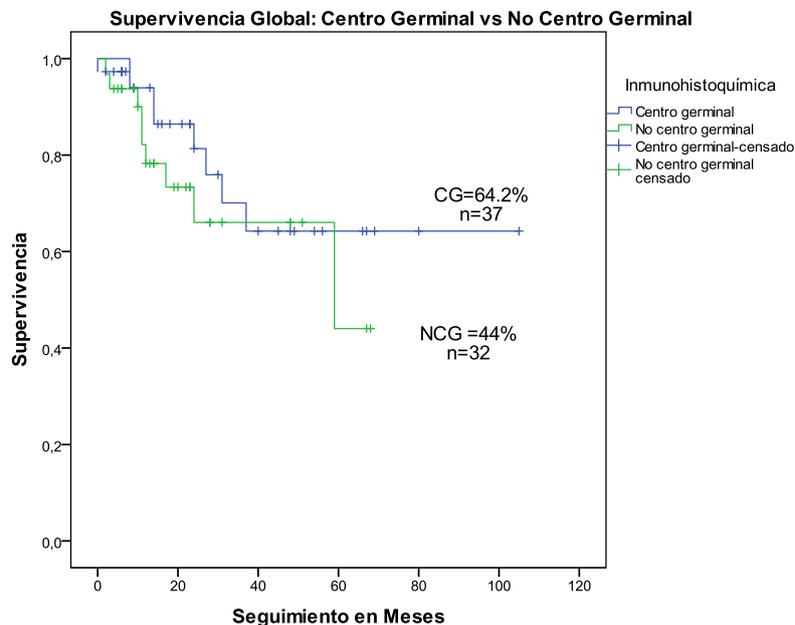


**Figura 3: Tiempo libre de Enfermedad global y tiempo libre de enfermedad (TLE) estratificada por IPI en pacientes con LDCG tratados con quimioterapia asociada a Rituximab.**



Según la clasificación por inmunohistoquímica de Hans en nuestra población (n=69) podemos distinguir los 2 grupos: LDCG-B de centro germinal (53.6%) y LDCG-B de no centro germinal (46.4%).

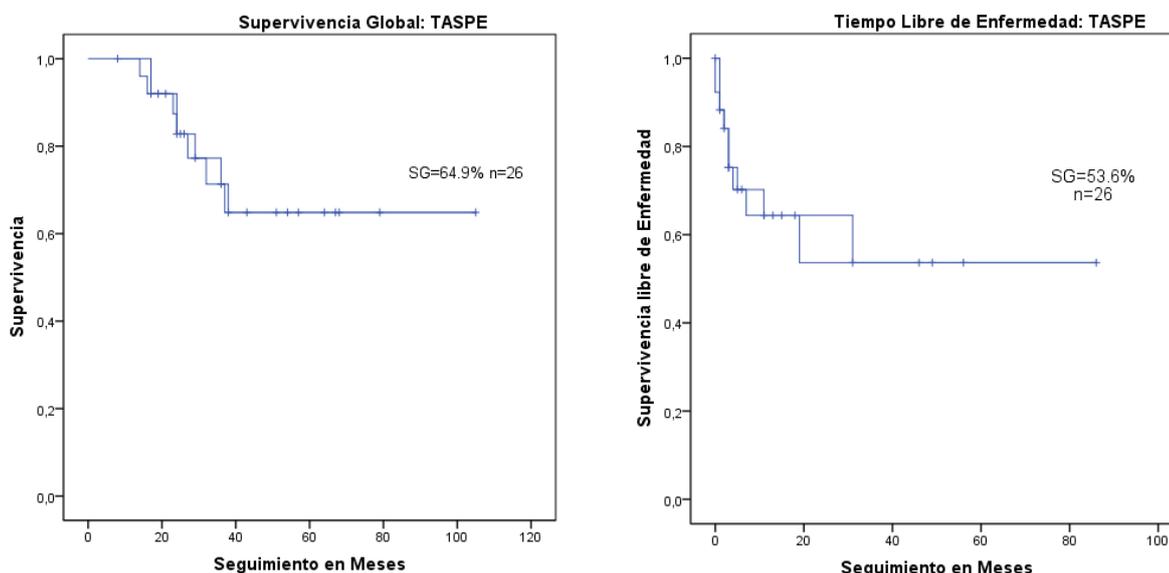
No detectamos diferencias significativas en la SG, siendo esta de 64% para el CG y de 44 % para NCG, con una media de seguimiento de 70 meses (límite inferior 56 meses y límite superior 84 meses, DE 7 meses). Tampoco se observaron diferencias significativas en el TLE.



### Trasplante Autólogo de Progenitores Hematopoyéticos

De los pacientes tratados con Rituximab se analizó el grupo que recibió un trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos (TASPE) (n=26) que incluye pacientes mayoritariamente en segunda RC; tuvieron una SG de 65% y un TLE 54% con una media de seguimiento de 77 meses (límite inferior 60 meses – límite superior 92 meses, DS 8.7 meses). La SG estratificada por IPI no mostró diferencias significativas en los distintos grupos. (Figura 4)

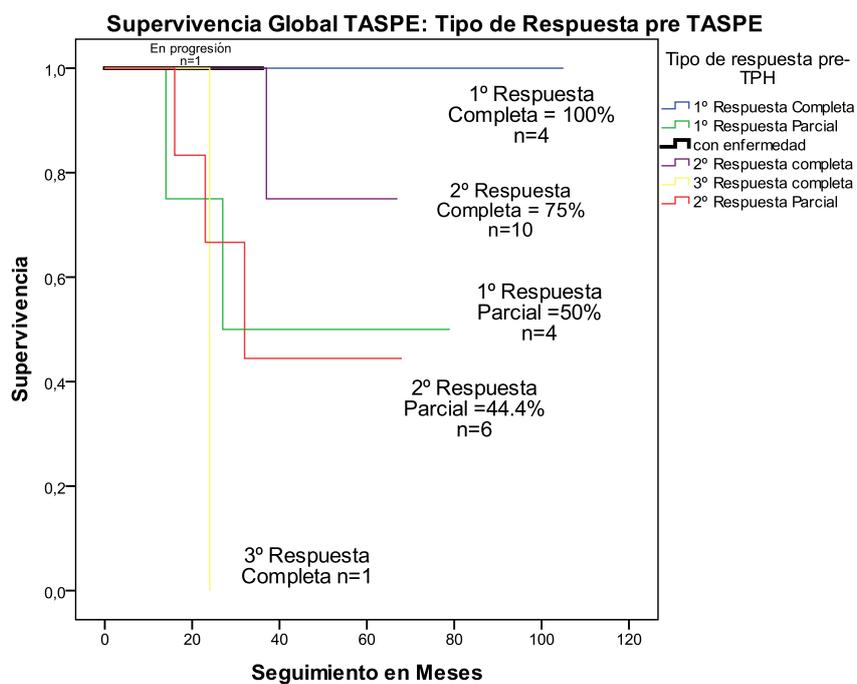
**Figura 4: Supervivencia Global (SG) y Tiempo libre de eventos (TLE) para los pacientes que reciben un trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos (TASPE).**



Debido a que en nuestro centro se realizó un protocolo en el cual se realizaba un TASPE a los pacientes jóvenes con IPI 2 o más en primera respuesta completa (1RC). La primera respuesta completa se define como la respuesta completa tras R-CHOP (una sola línea de tratamiento), no incluye a los pacientes que recibieron 2 líneas distintas de quimioterapia para alcanzar la primera respuesta completa. Tenemos una media de seguimiento de 46 meses (mínimo 14 meses y máximo 79 meses). Los pacientes trasplantados en primera respuesta completa (n=4) están todos vivos y libres de enfermedad hasta la fecha.

Por otro lado la supervivencia global de los pacientes con IPI mayor o igual de 2 que se trasplantaron en otra respuesta (segunda respuesta completa n=10, primera respuesta parcial n=4, segunda respuesta parcial n=6, tercera respuesta completa n=1, progresión n=1) (n= 22) tienen una supervivencia global de 58% y un TLE del 42%, acercándose ésta último a la significancia estadística respecto al grupo trasplantado 1RC ( $p=0.098$ ). (Figura 5).

**Figura 5: Supervivencia Global para los pacientes que reciben un trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos (TASPE) estratificado según el tipo de respuesta pre-TASPE. 1ºRC vs Otra respuesta en detalle.**



También analizamos la SG y el TLE en los pacientes que recibieron un TASPE según el tipo histológico al diagnóstico (n=7). La SG fue del 100% para NCG y del 20% para CG. Pero estas diferencias tampoco son estadísticamente significativas ( $p=0.106$ ).

#### Trasplante Alogénico de Precusores Hematopoyéticos

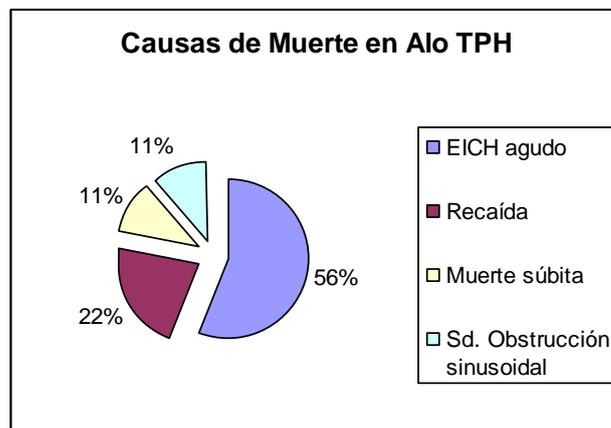
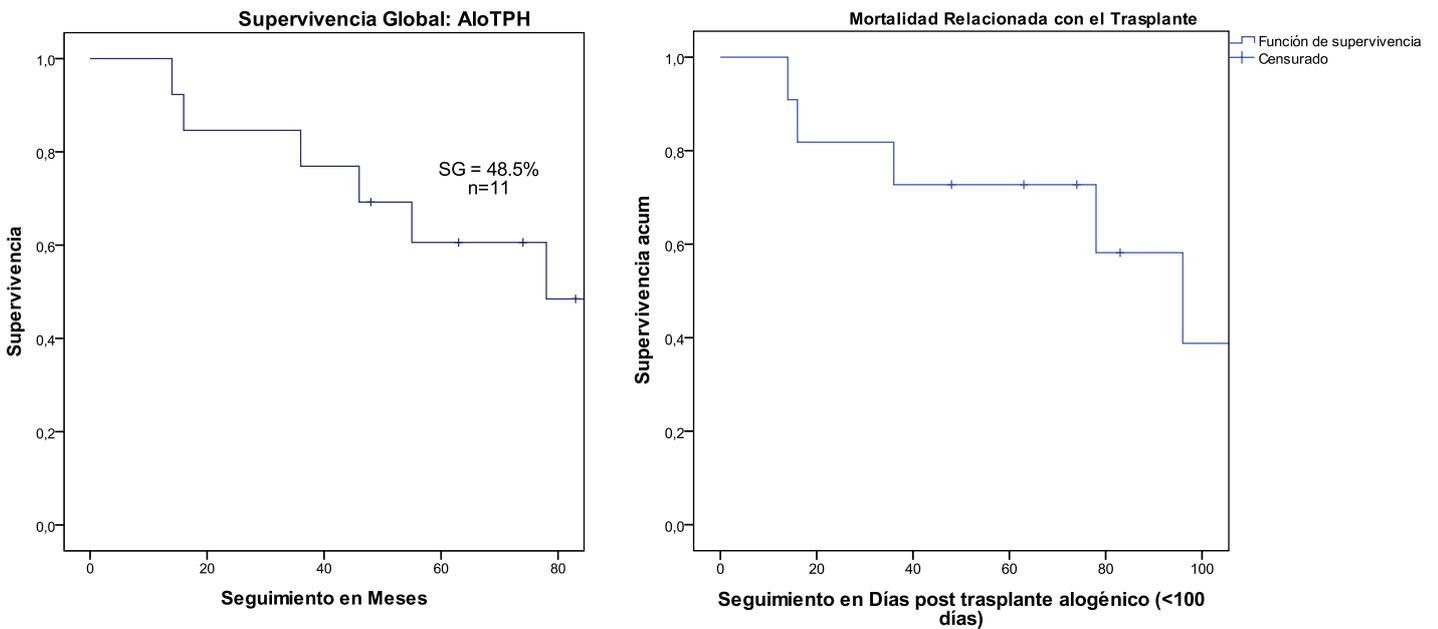
Para analizar los resultados con los trasplantes alogénicos realizados en nuestro centro se recogieron los datos del período 2001 – 2008 (n=13) independientemente de si recibieron Rituximab previamente al trasplante. En todos los casos la fuente de precusores hematopoyéticos fue la sangre periférica, el 46% de los casos eran de donantes no emparentados, todos HLA idénticos. El resto eran de donante familiar. Todos los acondicionamientos fueron de intensidad reducida:

- Melfalán 70 mg/m<sup>2</sup>-Fludarabina 40 mg/m<sup>2</sup>: 11 casos. En 2 casos asociado a Rituximab y en 1 caso a Zevalin en contexto de ensayos clínicos.
- Melfalán 140 mg/m<sup>2</sup>-Fludarabina 40 mg/m<sup>2</sup>: 2 casos

La profilaxis contra el EICH se realizó con Metotrexate – Ciclosporina en el 53% de los casos y con Ciclosporina – Micofenolato en el resto.

La SG fue de 49% a los 78 meses (mediana de seguimiento, límite inferior 34 meses y superior de 122 meses). En la actualidad, de los 13 pacientes alotrasplantados sólo permanecen vivos un total de 4 pacientes. Las causas de muerte de los fallecidos fueron: 5 (56%) por EICH refractaria, 2 (22%) por recaída de su enfermedad de base, 1 (11%) por muerte súbita y 1 (11%) por síndrome de obstrucción sinusoidal. La mortalidad relacionada con el trasplante, definida como la mortalidad debida a cualquier causa excepto la progresión de la enfermedad de base dentro de los primeros 100 días del trasplante fue del 60%. Fallecieron un total de 4 pacientes en los primeros 100 días por causas relacionadas al trasplante..

**Figura 6: Supervivencia Global de los pacientes que recibieron un trasplante alogénico de precursores hematopoyéticos independientemente de haber recibido Rituximab previamente y causas de muerte tras el alotrasplante de precursores hematopoyéticos (AloTPH)**



## **DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES:**

En los últimos años se han producido muchos cambios importantes en el esquema quimioterapéutico de distintas enfermedades hematológicas, esto debido a la adición de anticuerpos monoclonales dirigidos contra dianas de relevancia en la caracterización de la enfermedad o en su desarrollo.

En el caso del LDCG-B la aparición del Rituximab ha marcado un antes y un después sobretodo en los pacientes con un IPI de 2 o más. En nuestro centro la SG previa a la introducción del Rituximab era del 32% con una mediana de seguimiento de 70 meses y tras la adición de Rituximab es del 59% como hemos descrito en nuestros resultados.

Si hablamos de la supervivencia global estratificada por IPI era de 50% para un IPI bajo, de 38% para un IPI intermedio bajo, de 13% para un IPI intermedio alto y de 25% para un IPI alto mientras que tras la introducción del Rituximab tenemos para un IPI bajo 82% , IPI intermedio bajo 54%, IPI intermedio alto 51% e IPI alto de 33%. Con los resultados que presentamos en este trabajo podemos observar el impacto en la supervivencia dentro de nuestra propia población de pacientes tras la adición del Rituximab. Hemos podido analizar también, cuando estuvo disponible, la SG de los pacientes que recibieron quimioterapia asociada a Rituximab estratificado por la clasificación inmunohistoquímica de Hans sin observar diferencias estadísticamente significativas; de esta manera podemos afirmar que tras la introducción del Rituximab esta clasificación ha perdido valor pronóstico.

Con la evidencia actual, el papel del trasplante autólogo de precursores hematopoyéticos queda reservado para los pacientes que recaen tras una primera línea de tratamiento. Si bien hay algunos datos recientes que indican que no hay un beneficio al trasplantar a los pacientes jóvenes con IPI mayor de 2 en primera RC, estos datos son difíciles de interpretar debido a que el esquema estándar de primera línea en la mayoría de los centros es el R-CHOP y no otros esquemas más intensivos. Hacen falta más ensayos clínicos para resolver esta cuestión. Nuestra experiencia es muy favorable, pues todos los pacientes con IPI de 2 o más que alcanzaron respuesta completa tras R-CHOP y que recibieron un TASPE están vivos y libres de enfermedad. Si bien son pocos pacientes estos resultados son alentadores.

El trasplante alogénico en el LDCG-B debe limitarse a los pacientes en recidiva tras un TASPE o a aquellos que teniendo indicación de un TASPE no lograron movilizar progenitores hematopoyéticos para un TASPE. Como podemos ver en nuestra serie de 13 pacientes sorprendentemente sólo han muerto 2 (9 fallecidos en total) por recaída o progresión de su enfermedad lo que podría indicar la presencia del efecto injerto contra tumor. En nuestros pacientes fallecidos la mortalidad se ha debido mayoritariamente a EICH refractario, lo que sugiere, al igual que en el resto de enfermedades hematológicas, que aún debemos mejorar en el manejo inmunosupresor y en identificar las posibles condiciones que llevan a su desarrollo.

En general, el objetivo en los próximos años es conocer mejor la patogénesis de cada enfermedad, o más aún de cada tipo de linfoma que afecta a un paciente en particular y de esta manera poder dar un tratamiento personalizado y dirigido.

Con los resultados obtenidos se confirman los datos publicados en los últimos años donde se observa una mejoría en la SG y el TLE en los pacientes que reciben Rituximab como primera línea de tratamiento. El trasplante autólogo de precursores hematopoyéticos de momento se reserva para los pacientes que recaen y reciben una quimioterapia de rescate.

El trasplante alogénico puede ser efectivo para controlar la enfermedad en aquellos pacientes que recaen tras un trasplante autólogo.,si bien, en el futuro deben de hacerse esfuerzos por reducir la mortalidad asociada a la EICH, cuándo está indicado, no queda claro. Nuestra experiencia respecto a la mortalidad relacionada con el trasplante confirma los resultados con otras patologías, la principal causa de muerte es el EICH refractario. El efecto injerto contra tumor podría jugar un papel en este grupo de pacientes.

## BIBLIOGRAFIA

1. MA. Lichtman, E. Beutler, T. Kipps, U. Seligsohn, K. Kaushansky, JT. Prchal. Williams Hematology. Seventh Edition. McGraw-Hill Medical.
2. SH. Swerdlow, E. Campo, N. Lee Harris, ES. Jaffe, SA. Pileri, H. Stein, J. Thiele, JW. Vardiman. WHO Classification of Tumours of Haemotopoietic and Lymphoid Tissues.. Fourth Edition. International Agency for Research on Cancer.
3. A Clinical Evaluation of the International Lymphoma Study Group Classification of Non-Hodgkin's Lymphoma. The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. Blood 1997 89: 3909-3918.
4. JO. Armitage, DD. Weisenburger. New approach to classifying non-Hodgkin's lymphomas: clinical features of the major histologic subtypes. Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. J Clin Oncol 16: 2780-2795.
5. A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma. The Non-Hodgkin's Lymphoma classification Project. Blood 1997:89:3909-3918.
6. F. Groves, MS. Linet, LB. Travis, SS. Devesa. Cancer surveillance series: Non-Hodgkin's lymphoma incidence by histologic subtype in the United States from 1978 through 1995. J Natl Cancer Inst 92: 1240, 2000.
7. BH. Ye, F. Lista, F. Lo Coco, et al. Alterations of zinc finger-encoding gene, BCL-6, in diffuse large-cell lymphoma. Science 262: 747, 1993.
8. F. Lo Coco, BH. Ye, F. Lista, et al. Rearrangements of the BCL6 gene in diffuse large-cell Non-Hodgkin's lymphoma. Blood 83: 1757, 1994.
9. G. Gaidano, F. Lo Coco, BH. Ye, et al. Rearrangements of the BCL6 gene in acquired immunodeficiency syndrome-associated non-Hodgkin's lymphoma: Association with diffuse large – cell subtype. Blood 84: 397, 1994.
10. R. Dalla-Favera, A. Migliazza, CC. Chang, et al. Molecular pathogenesis of B cell malignancy: The role of BCL-6. Curr Top Microbiol Immunol 246: 257, 1999.
11. BH. Ye, S. Chiganti, CC. Chang, et al. Chromosomal translocations cause deregulated BCL6 expression by promoter substitution in B cell lymphoma. EMBO J. 14:6209, 1995.
12. YY. Kaneita, S. Yoshida, N. Ishiguro, et al. Detection of reciprocal fusión 5' – BCL6/partner-3' transcripts in lymphomas exhibiting reciprocal BCL6 translocation. Br J Haematol 113: 803, 2001.

13. CY. Chang, BH. Ye, RS. Chaganti, R. Dalla-Favera: BCL-6, a POZ/zinc-finger protein, is a sequence-specific transcriptional repressor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:6947, 1996.
14. F. Lo Coco, G. Gaidano, DC. Louie, et al. P53 mutations are associated with histologic transformation of follicular lymphoma. *Blood* 82: 2289, 1993.
15. L. Pasqualucci, P. Neumeistes, T. Goossens, et al. hypermutation of multiple proto-oncogenes in B cell difusse large B-cell lymphomas. *Nature* 412: 341, 2001.
16. AA. Alizadeh, MB. Eisen, RE. Davis, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 403: 503, 2000.
17. JS. Huang, WG. Sanger, TC. Greiner, et al. The t(14; 18) defines a unique subset of diffuse large B-cell lymphoma with a germinal center B-cell gene expression profile. *Blood* 99: 2285, 2002.
18. RA. Gascoyne, SA. Adomat, S. Krajewski, et al. Prognostic significance of Bcl-2 protein expression and Bcl-2 gene rearrangement in diffuse aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 90: 244, 1997.
19. IS. Lossos, CD. Jones, R. Warnke, et al. Expression of a single gene, BCL-6, strongly predicts survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 98: 945, 2001.
20. WWL. Choi, DD. Weisenburger, TC. Greiner, MA. Piris, AH. Banham, J. Delabie, RM. Braziel, H. Geng, J. Iqbal, G. Lenz, JM. Vose, CP. Hans, K. Fu, LM. Smith, M. Li, Z. Liu, RD. Gascoyne, A. Rosenwald, G. Ott, LM. Rimsza, E. Campo, ES. Jaffe, DL. Jaye, LM. Staudt, WC. Chan. A New Immunostain Algorithm Classifies Diffuse Large B-Cell Lymphoma into Molecular Subtypes with High Accuracy. *Clin Cancer Res* 2009;15(17): 5494–502.
21. C. Hans, DD. Weisenburger, TC. Greiner, et al. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood* 103: 275, 2004.
22. AN. Aviles, H. Neri, J. Guerra – Guzman. Large bowel lymphoma: An analysis of prognostic factors and therapy in 53 patients. *J Surg Oncol* 80: 111, 2002.
23. SH. Paryani, RT. Hope, JS. Burke, et al. Extralymphatic involvement in diffuse non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 1: 682, 1983.
24. SH. Bernstein, JM. Unger, M. Leblanc, J. Friedberg, TP. Miller, RI. Fisher. Natural history of CNS relapse in patients with aggressive non-Hodgkin's lymphoma: a 20-year follow-up analysis of SWOG . *J Clin Oncol*. 2009 Jan 1;27(1):114-9. Epub 2008 Dec
25. R. Doggett, GS. Wood, S. horning, et al. the immunologic characterization of 95 nodal and extranodal diffuse large cell lymphoma in 89 patients. *Am J Pathol* 115: 245, 1984.

26. H. Stein, K. Lennert, AC. Feller, DY. Mason. Immunological analysis of human lymphoma: Correlation of histological and immunological categories. *Adv Cancer Res* 42: 67, 1984.
27. M. Yamaguchi, M. Seto, M. Okamoto, et al. De novo CD5+ diffuse large B-cell lymphoma: A clinicopathologic study of 109 patients. *Blood* 99: 815, 2002.
28. R. Stauder, W. Eisterer, J. Thaler, U. Gunthert. CD44 variant isoforms in non-Hodgkin's lymphoma: a new independent prognostic factor. *Blood* 85: 2885, 1995.
29. The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project. A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 329:987-994, 1993.
30. IS. Lossos, DK. Czerwinski, AA. Alizadeh, et al: Prediction of survival in diffuse large-B-cell lymphoma based on the expression of six genes. *N Engl J Med* 350:1828–1837, 2004.
31. J. Iqbal, VT. Neppalli, G. Wright, et al: BCL2 expression is a prognostic marker for the activated B-cell-like type of diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 24:961–968, 2006.
32. SL. Barrans, I. Carter, RG. Owen, et al: Germinal center phenotype and bcl-2 expression combined with the International Prognostic Index improves patient risk stratification in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 99:1136–1143, 2002.
33. SL. Barrans, JA. Fenton, A. Banham, et al: Strong expression of FOXP1 identifies a distinct subset of diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) patients with poor outcome. *Blood* 104:2933–2935, 2004.
34. AH. Banham, JM. Connors, PJ. Brown, et al: Expression of the FOXP1 transcription factor is strongly associated with inferior survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Clin Cancer Res* 11:1065–1072, 2005.
35. SL. Barrans, SJ. O'Connor, PA. Evans, et al: Rearrangement of the BCL6 locus at 3q27 is an independent poor prognostic factor in nodal diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol* 117:322–332, 2002.
36. SL. Barrans, PA. Evans, SJ. O'Connor, et al: The t(14;18) is associated with germinal center-derived diffuse large B-cell lymphoma and is a strong predictor of outcome. *Clin Cancer Res* 9:2133–2139, 2003.
37. L. Pasqualucci, M. Compagno, J. Houldsworth, et al: Inactivation of the PRDM1/BLIMP1 gene in diffuse large B cell lymphoma. *J Exp Med* 203:311–317, 2006.
38. W. Tam, M. Gomez, A. Chadburn, et al: Mutational analysis of PRDM1 indicates a tumor-suppressor role in diffuse large B-cell lymphomas. *Blood* 107:4090–4100, 2006.

39. N. Mounier, J. Briere, C. Gisselbrecht, et al: Rituximab plus CHOP (CHOP-R) overcomes bcl-2-associated resistance to chemotherapy in elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL). *Blood* 101:4279–4284, 2003.
40. JN. Winter, EA. Weller, SJ. Horning, et al: Prognostic significance of Bcl-6 protein expression in DLBCL treated with CHOP or R-CHOP: A prospective correlative study. *Blood* 107:4207–4213, 2006  
Erratum in: *Blood* 109:2292, 2007.
41. H. Nyman, M. Adde, ML. Karjalainen-Lindsberg , et al: Prognostic impact of immunohistochemically defined germinal center phenotype in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with immunochemotherapy. *Blood* 109:4930–4935, 2007.
42. MH. Kramer, J. Hermans, E. Wijburg, et al: Clinical relevance of BCL2, BCL6, and MYC rearrangements in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 92:3152–3162, 1998.
43. M. Hummel, S. Bentink, H. Berger, et al: A biologic definition of Burkitt's lymphoma from transcriptional and genomic profiling. *N Engl J Med* 354:2419–2430, 2006.
44. S. Le Gouill, P. Talmant, C. Touzeau, et al: The clinical presentation and prognosis of diffuse large B-cell lymphoma with t(14;18) and 8q24/c-MYC rearrangement. *Haematologica* 92:1335–1342, 2007.
45. N. Niitsu, M. Okamoto, I. Miura, et al: Clinical significance of 8q24/c-MYC translocation in diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer Sci* 100:233–237, 2009.
46. MG. Tibiletti, V. Martin, B. Bernasconi, et al: BCL2, BCL6, MYC, MALT 1, and BCL10 rearrangements in nodal diffuse large B-cell lymphomas: A multicenter evaluation of a new set of fluorescent in situ hybridization probes and correlation with clinical outcome. *Hum Pathol* 40:645–652, 2009.
47. N. Tomita, M. Tokunaka, N. Nakamura, et al: Clinicopathological features of lymphoma/leukemia patients carrying both BCL2 and MYC translocations. *Haematologica* 94:935–943, 2009.
48. EC. Obermann, M. Csato, S. Dirnhofer, et al: Aberrations of the MYC gene in unselected cases of diffuse large B-cell lymphoma are rare and unpredictable by morphological or immunohistochemical assessment. *J Clin Pathol* 62:754–756, 2009.
49. S. Barrans, S. Crouch, A. Smith, K. Turner, R. Owen, R. Patmore, E. Roman, A. Jack. Rearrangement of MYC is associated with poor prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated in the era of Rituximab. *J Clin Oncol* 28: 3360-3365, 2010.
50. ME. Juweid, S. Stroobants, OS. Hoekstra, et al. Use of positron emission tomography for response assessment of lymphoma: consensus of the Imaging Subcommittee of International Harmonization Project in lymphoma. *J Clin Oncol* 2007;25: 571–578.

51. JM. Zijlstra, WG. Lindauer-van der, OS. Hoekstra, Hooft L, II. Riphagen, PC. Huijgens. 18 F-fluoro-deoxyglucose positron emission tomography for post-treatment evaluation of malignant lymphoma: a systematic review. *Haematologica* 2006;91: 522–529.
52. BD. Cheson, B. Pfistner, ME. Juweid, et al. Revised response criteria for malignant lymphoma. *J Clin Oncol* 2007;25:579–586.
53. K. Dunleavy, RF. Little, S. Pittaluga, N. Grant, AS. Wayne, JA. Carrasquillo, SM. Steinberg, R. Yarchoan, ES. Jaffe, WH. Wilson. The role of tumor histogenesis, FDG-PET, and short-course EPOCH with dose-dense rituximab (SC-EPOCH-RR) in HIV-associated diffuse large B-cell lymphoma. Center for Cancer Research, National Cancer Institute, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA. *Blood*. 2010 Apr 15; 115(15):3017-24.
54. M. Meignan, A. Gallamini, C. Haioun. Report on the first international workshop on interim-PET scan in lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2009; 50:1257–1260.
55. C. Lin, E. Itti, C. Haioun, et al. Early 18 F-FDG PET for prediction of prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma: SUV-based assessment versus visual analysis. *J Nucl Med* 2007;48:1626–1632.
56. C. Haioun, E. Itti, A. Rahmouni, et al. [18 F] - fluoro-2-deoxy-D-glucose positron emission tomography (FDG-PET) in aggressive lymphoma: an early prognostic tool for predicting patient outcome. *Blood* 2005; 106:1376–1381.
57. NG. Mikhaeel, M. Hutchings, PA. Fields, MJ. O'Doherty, AR. Timothy. FDG-PET after two to three cycles of chemotherapy predicts progression-free and overall survival in high-grade non-Hodgkin lymphoma. *Ann Oncol* 2005; 16:1514–1523.
58. K. Spaepen, S. Stroobants, P. Dupont, et al. Early restaging positron emission tomography with (18)F-fluorodeoxyglucose predicts outcome in patients with aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Ann Oncol* 2002; 13:1356–1363.
59. TS. Lee, SH. Ahn, BS. Moon, et al. Comparison of 18F-FDG, 18F-FET and 18F-FLT for differentiation between tumor and inflammation in rats. *Nucl Med Biol* 2009; 36:681–686.
60. RI. Fisher, TP. Miller, OA. O'Connor: Diffuse aggressive lymphoma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2004 ;221-36.
61. M. Pfreundschuh, L. Trumper, M. Kloess, R. Schmits, AC. Feller, C. Rube, C. Rudolph, M. Reiser, DK. Hossfeld, H. Eimermacher, D.Hasenclever, N. Schmitz, M. Loeffler; German High-Grade Non-Hodgkin's Lymphoma Study Group. Two-weekly or 3-weekly CHOP chemotherapy with or without

- etoposide for the treatment of elderly patients with aggressive lymphomas: results of the NHL-B2 trial of the DSHNHL. *Blood* 2004; 104(3):634-41.
62. M. Pfreundschuh, L. Trumper, M. Kloess, R. Schmits, AC. Feller, C. Rudolph, M. Reiser, DK. Hossfeld, B. Metzner, D. Hasenclever, N. Schmitz, B. Glass, C. Rube, M. Loeffler; German High-Grade Non-Hodgkin's Lymphoma Study Group. Two-weekly or 3-weekly CHOP chemotherapy with or without etoposide for the treatment of young patients with good-prognosis (normal LDH) aggressive lymphomas: results of the NHL-B1 trial of the DSHNHL. *Blood* 2004;104(3):626-33.
  63. B. Coiffier, E. Lepage, J. Briere, et al: CHOP chemotherapy plus Rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 346:235-242, 2002.
  64. P. Feugier, A. Van Hoof , C. Sebban, P. Solal-Celigny, R. Bouabdallah, C. Ferme, B. Christian, E. Lepage, H. Tilly, F. Morschhauser, P. Gaulard, G. Salles, A. Bosly, C. Gisselbrecht, F. Reyes, B. Coiffier: Long-term results of the R-CHOP study in the treatment of elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma: a study by the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte. *J Clin Oncol.* 2005 Jun 20;23(18):4117-26.
  65. M. Pfreundschuh, M. Kloess, R.Schmits,S. Zeynalova, E. Lengfelder, A. Franke, H. Steinhauer, M. Reiser, M. Clemens, C. Nickenig, M. de Wit, M. Hoffmann, R. Mertelsmann, B. Metzner, A. Ho, L. Truemper, H. Eimermacher, H. Mergenthaler, R. Liersch, U. Duehresen, L. Balleisen, F. Hartmann, V. Poeschel, N. Schmitz, M. Loeffler: Six, Not Eight Cycles of Bi-Weekly CHOP with Rituximab (R-CHOP-14) Is the Preferred Treatment for Elderly Patients with Diffuse Large B-Cell Lymphoma (DLBCL): Results of the RICOVER-60 Trial of the German High-Grade Non-Hodgkin Lymphoma Study Group (DSHNHL). *ASH 2005; Blood 2005; 106(11): abstract no. 13.*
  66. N. Milpied, E. Deconinck, F. Gaillard, V. Delwail, C. Foussard, C. Berthou, R. Gressin, V. Lucas, P. Colombat, JL. Harousseau; Groupe Ouest-Est des Leucemies et des Autres Maladies du Sang. Initial treatment of aggressive lymphoma with high-dose chemotherapy and autologous stem-cell support. *N Engl J Med.* 2004;350(13):1287-95.
  67. B. Glass, M. Kloess, A. Engert, W. Berdel, B. Metzner, L. Truemper, M. Loeffler, M. Pfreundschuh, N. Schmitz on behalf of DSHNHL: Dose escalated CHOP + etoposide and repetitive autologous stem cell transplantation (MegaCHOEP) with and without rituximab for primary treatment of aggressive NHL. *J Clin Oncol* 2005 23(16S): 6654.
  68. H. Wilson, P. Porcu, D. Hurd, SE. Martin, M. Czuczman, D. Niedzwiecki, JD. Saint Louis, JL. Johnson, B. Cheson, GP. Canellos, AD. Zelenetz: Phase II study of Dose-Adjusted EPOCH-R in untreated de novo CD20+ diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL)-CALGB 50103. *Journal of Clinical*

Oncology, 2005 ASCO Annual Meeting Proceedings. Vol 23, No. 16S, Part I of II (June 1 Supplement), 2005: 6530

69. L. Casanova, D. Venega, M. Paola, J. León, C. Flores: Observation vs ESHAP as consolidation therapy in stages III-IV Non-Hodgking's Lymphoma in patients with complete remission with CHOP: Non-Randomized Comparative Study. *Journal of Clinical Oncology*, 2005 ASCO Annual Meeting Proceedings. Vol 23, No. 16S, Part I of II (June 1 Supplement), 2005: 6690.
70. T. Intragumtornchai, U. Bunworasate, TN. Nakorn, P. Rojnuckarin: Rituximab-CHOP-ESHAP vs CHOP-ESHAP-high-dose therapy vs conventional CHOP chemotherapy in high-intermediate and high-risk aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Leuk Lymphoma*. 2006 Jul;47(7):1306-14.
71. M. Pfreundschuh, L. Trumper, A. Osterborg, et al: CHOP-like chemotherapy plus rituximab versus CHOP-like chemotherapy alone in young patients with good-prognosis diffuse large-B-cell lymphoma: A randomised controlled trial by the MabThera International Trial (MInT) Group. *Lancet Oncol* 7:379-391, 2006.
72. T. Philip, C. Guglielmi, A. Hagenbeek, et al: Autologous bone marrow transplantation as compared with salvage chemotherapy in relapses of chemotherapy-sensitive non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 333:1540-1545, 1995.
73. T. Philip, JO. Armitage, G. Spitzer, et al: High-dose therapy and autologous bone marrow transplantation after failure of conventional chemotherapy in adults with intermediate-grade or high-grade non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 316:1493-1498, 1987.
74. C. Guglielmi, F. Gomez, T. Philip, et al: Time to relapse has prognostic value in patients with aggressive lymphoma enrolled onto the Parma trial. *J Clin Oncol* 16:3264-3269, 1998.
75. J. Blay, F. Gomez, C. Sebban, et al: The International Prognostic Index correlates to survival in patients with aggressive lymphoma in relapse: Analysis of the PARMA trial. Parma Group. *Blood* 92: 3562-3568, 1998.
76. PA. Hamlin, AD. Zelenetz, T. Kewalramani, et al: Age-adjusted International Prognostic Index predicts autologous stem cell transplantation outcome for patients with relapsed or primary refractory diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 102:1989-1996, 2003.
77. E. Vellenga, WL. van Putten, MB. Van't Veer, et al: Rituximab improves the treatment results of DHAP-VIM-DHAP and ASCT in relapsed/progressive aggressive CD20\_ NHL: A prospective randomized HOVON trial. *Blood* 111:537-543, 2008.
78. C. Gisselbrecht, B. Glass, N. Mounier, D. Singh Gill, DC. Linch, M. Trneny, A. Bosly, N. Ketterer, O. Shpilberg, H. Hagberg, D. Ma, J. Briere, CH. Moskowitz, and N. Schmitz. Salvage Regimens With

Autologous Transplantation for Relapsed Large B-Cell Lymphoma in the Rituximab Era. *J Clin Oncol*. 2010 Jul 26.

79. AJ. Peniket, MCR de Elvira, G. Taghipour, et al. An EBMT registry matched study of allogeneic stem cell transplants for Lymphoma: Allogeneic transplantation is associated with a lower relapse rate but higher procedures-related mortality rate than autologous transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2003; 31: 667 – 678.
80. RT. Doocey, CL. Toze, JM. Connors, et al. Allogeneic haematopoietic stem cell transplantation for relapsed and refractory aggressive histology non-Hodgkin lymphoma. *Br J Haematol* 2005; 131: 223 – 230.