

LINFOMAS NO-HODGKIN B DE ALTO GRADO: RECLASIFICACIÓN SEGÚN CRITERIOS OMS 2016 Y SU VALOR COMO FACTOR PRONÓSTICO

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

INICIACIÓN A LA INVESTIGACIÓN EN MEDICINA

Alumno : Hristo Iliev Iliev

Director: Dr. Francesc Felipo Berlanga

CONTENIDOS

RESUMEN	5
INTRODUCCIÓN	8
OBJETIVOS	11
MATERIALES Y MÉTODOS	12
TIPO DE ESTUDIO	12
INMUNOHISTOQUÍMICA	12
FISH	12
ESTADÍSTICA	12
ASPECTOS ÉTICOS	13
DISCUSIÓN	14
1. LBDCG	14
1.1. Etiología	14
1.2. Epidemiología y presentación clínica	14
1.3. Morfología	15
1.4. Inmunofenotipo	16
1.5. Célula de Origen	16
1.6. Perfil genético	18
1.6.1. Genes del receptor de antígenos	18
1.6.2. Alteraciones citogenéticas	19
1.6.3. Otras alteraciones genéticas	21
1.7. Factores pronósticos en LBDCG	21
1.7.1. IPI score	22
1.7.2. Célula de origen	22

1.7.3. Reordenamiento o copias extra de <i>MYC</i>	23
1.7.4. Linfomas Doble Hit (DH)	23
1.7.5. Linfomas Doble Hit atípicos	25
1.7.6. Linfomas Doble Expresores (LDE)	25
1.7.7. Mutaciones de <i>TP53</i> y expresión de p53	26
1.7.8. LBDCG CD5+	27
1.8. Tratamiento	27
2. LINFOMAS B DE ALTO GRADO (LBAG)	29
2.1. LBAG, NOS	29
2.2. LBAG con reordenamientos de <i>MYC</i> , <i>BCL2</i> y/o <i>BCL6</i>	30
2.2.1. LDH <i>MYC/BCL2</i>	30
2.2.1.1. Características clínicas	30
2.2.1.2. Inmunofenotipo	32
2.2.1.3. Alteraciones citogenéticas	32
2.2.2. LDH <i>MYC/BCL6</i>	33
2.2.3. LTH <i>MYC/BCL2/BCL6</i>	34
2.2.4. DIAGNÓSTICO	34
2.2.5. PRONÓSTICO	36
CONCLUSIONES	38
BIBLIOGRAFÍA	40

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

La clasificación de los tumores de los tejidos hematopoyéticos y linfoides de la OMS del año 2016 define una nueva categoría, el Linfoma No-Hodgkin B de alto grado (LBAG), que incluye a los LBAG, NOS y los LBAG con translocación de MYC, BCL2 y/o BCL6, también denominados linfomas doble/triple hit (LDH/TH). Estos linfomas representan 1-2% de los linfomas no-Hodgkin y una parte importante de los linfomas B difusos de célula grande (LBDCG) refractarios a la terapia con R-CHOP. Este grupo de linfomas es equiparable a los linfomas B inclasificables, con rasgos intermedios entre LBDCG y linfoma de Burkitt (LBI) en la clasificación la OMS del año 2008. Durante la última década, los LBAG DH/TH han llamado la atención de los hematólogos y los oncólogos, debido a su significativo peor pronóstico.

OBJETIVOS

El presente trabajo tiene como finalidad, presentar la base teórica de la incorporación de este nuevo grupo de neoplasias, resumir sus criterios diagnósticos actuales y explicar la importancia de su separación de los LBDCG. Además se expondrá la metodología de un estudio que va a comprobar la reproducibilidad de estos criterios en la casuística de los HCU Lozano Blesa y HU Miguel Servet, y su repercusión en el pronóstico de los pacientes afectados por este tipo de neoplasia.

MATERIALES Y METODOS

En primer lugar se realizará una búsqueda bibliográfica exhaustiva del conocimiento acumulado sobre esta entidad en los bases de datos PubMed y EMBASE.

A base de la información recopilada se propondrá la realización un estudio observacional retrospectivo en pacientes diagnosticados de LBDG en los hospitales HCU Lozano Blesa y del HU Miguel Servet entre enero de 2005 hasta diciembre de 2015. Tras la reevaluación y confirmación de los diagnósticos, se aplicarán los nuevos criterios, utilizando técnicas inmunohistoquímicas y citogenéticas (FISH) para separar los casos de LDH/TH de los LBDCG. A continuación se analizarán la supervivencia global y la supervivencia libre de progresión entre ambos grupos y se comprobará el papel del perfil de LDH/TH como factor pronóstico.

CONCLUSIÓN

Los LDH/TH son linfomas agresivos y refractarios al tratamiento estandar. Su diagnóstico correcto es de gran importancia para la identificación de estos pacientes de alto riesgo y su inclusión en estudios clínicos con el fin de encontrar esquemas terapéuticos más efectivos.

ABSTRACT

INTRODUCTION

The designation high-grade B-cell lymphoma (HGBL) has been incorporated into the 2016 Revision of the WHO classification of lymphoid neoplasms and includes two types: (1) HGBL, not otherwise specified; and (2) HGBL with MYC and BCL2 and/or BCL6 rearrangements, also known as double or triple hit lymphoma (DHL/THL). These categories of lymphomas represent 1–2% of non-Hodgkin lymphomas and a considerable portion of DLBCL patients who are primary refractory to R-CHOP therapy. It corresponds to the designation 'B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between DLBCL and Burkitt lymphoma' in the 2008 WHO classification. In the last decade, it has called the attention of hematologists and oncologists, due to its worse prognosis.

OBJECTIVES

In this paper we revise the theory behind the incorporation of this new group of neoplasias, its diagnostic criteria and explain the importance of its differentiation from the DLBCL. Also, we present the methodology of a study, designed to confirm the reproducibility of those criteria in the practice of the departments of pathology of the hospitals HCU Lozano Blesa and HU Miguel Servet and explore their value as a prognostic factor in the patients affected by these diseases.

MATERIALS AND METHODS

First of all, a bibliographic research on the topic will be performed, using the databases PubMed and EMBASE.

Using the gathered information, we propose an observational retrospective study including patients with DLBCL, diagnosed between January 2005 and December 2015 in HCU Lozano Blesa and HU Miguel Servet. A histological and immunohistochemical revision of the previous diagnosis will be performed, together with cytogenetic studies (FISH) in order to detect the cases of DH/THL among the DLBCLs. Overall survival and Progression free survival periods will be compared and analysed between both groups, and the predictive value of the DH/TH status will be tested.

CONCLUSION

DH/THL are aggressive diseases, mostly resistant to the usual therapy regimens. The correct diagnosis of DH/THL is of great importance for the identifications of those high-risk patients and their inclusion in clinical trials, in order to develop novel and more effective therapies.

INTRODUCCIÓN

La clasificación de los Tumores de los tejidos hematopoyéticos y linfoides de la OMS [1] del año 2016 define una nueva categoría, el Linfoma No-Hodgkin B de alto grado (LBAG), que incluye a linfomas agresivos de células B maduras, que, por razones biológicas y clínicas, no se deberían diagnosticar como Linfoma B Difuso de Célula Grande (LBDCG), sin otras especificaciones (NOS), ni como Linfoma de Burkitt (LB).

Existen dos subgrupos de LBAG. El primero, LBAG con reordenamiento de *MYC* y *BCL2* y/o *BCL6*, engloba a todos los linfomas B con reordenamiento del gen *MYC* junto con reordenamiento del gen *BCL2* y/o *BCL6*, también denominados Linfomas B doble/triple hit (DH/TH). Estas neoplasias habitualmente presentan rasgos morfológicos de LBDCG, NOS o intermedios entre LBDCG y LB, definidas como Linfoma B inclasificable (LBI) con rasgos intermedios entre LBDCG y LB en la edición del año 2008 de la clasificación de la OMS. Menos frecuentemente pueden presentar morfología blastoide, semejante al Linfoma linfoblástico o la variante blastoide del Linfoma del manto.

El segundo subgrupo, LBAG, NOS, incluye casos con morfología de LBI o blastoide, pero por definición no alberga doble/triple hit genético. Este diagnóstico se debe aplicar con precaución y solo en los casos en los que un linfoma no se puede clasificar con certeza como LBDCG o LB. Los casos con rasgos de LBDCG, deben ser diagnosticados como tales. Existen pocos datos epidemiológicos sobre los LBAG, NOS, dado que en la mayoría de las publicaciones los LBAG NOS y DH/TH han sido descritos juntos. El perfil inmunohistoquímico tampoco está bien definido, debido a su naturaleza muy heterogénea. Por todo ello este estudio se centrará en los LBAG DH/TH.

Los Linfomas DH/TH son agresivos, afectan a pacientes en la sexta – séptima década de la vida y 70-100% de ellos debutan con enfermedad avanzada, más de una localización extranodal, incluyendo la médula ósea y el sistema nervioso central (estadio IV de la clasificación Ann Arbor), alto Índice Pronóstico Internacional (IPI) y elevados niveles de lactato deshidrogenasa (LDH). Los datos sobre los linfomas con DH/TH hasta el momento han demostrado que estos tienen peor pronóstico, con mala respuesta a la terapia habitual (R-CHOP) y bajas tasas de supervivencia, siendo la media de 4,5 – 18,5 meses. [1]

Inmunohistoquímicamente, expresan marcadores de la línea B (CD19, CD20, CD79a, PAX5), con marcadores de células precursoras (TdT) negativos. La gran mayoría de los Linfomas DH con reordenamiento *MYC* y *BCL2* se asocian con perfil de células del centro germinal (GCB), determinado con el algoritmo de Hans (CD10+, BCL6+/-, MUM1/IRF4-), mientras que los casos DH *MYC* y *BCL6* y los TH tienen predominantemente perfil de célula B activada (ABC) (CD10-, BCL6+/-, MUM1/IRF4+).

La mayoría de los linfomas DH muestran doble expresión inmunohistoquímica de *MYC* y *BCL2*, pero la literatura hace hincapié en la importancia de diferenciar entre Linfoma con DH y los Linfomas Doble Expresores (LDE). Los LDE son aquellos, que muestran expresión de los productos de *MYC* y *BCL2*, detectada inmunohistoquímicamente, sin que se detecte reordenamiento de dichos genes. Esto puede ser debido a alteraciones genéticas de *MYC* y *BCL2*, que no son translocaciones (amplificaciones, mutaciones activadoras y/o afectaciones epigenéticas). [2] Los LDE albergan translocaciones de *MYC* y *BCL2* en un número de casos muy reducido (<20%) [3]. Se ha demostrado que estos casos tienen peor pronóstico que los LBDCG habituales, pero diferente de los Linfomas DH/TH.[4]

Los Linfomas DH/TH tienen determinadas características morfológicas, pero lo que de verdad los define como entidad son las alteraciones genéticas, detectadas con técnicas citogenéticas o moleculares, principalmente hibridación in situ fluorescente (FISH) [1]

El gen *MYC*, localizado en cromosoma 8q24, codifica un factor de transcripción importante en la regulación de la proliferación, crecimiento, apoptosis y diferenciación celular. Su translocación es marcador molecular del Linfoma de Burkitt (LB), pero también está presente en 5-14% de los LBDCG.

Además de *MYC*, todos los linfomas DH/TH exhiben reordenamiento de *BCL2* y/o *BCL6*. *BCL2* (18q21) codifica una proteína inhibidora de la apoptosis. Su translocación es el sello distintivo del Linfoma folicular, pero también aparece en 20–30 % de los LBDCG.

El producto de *BCL6* (3q27) es un represor de transcripción en células B del centro germinal, cuyo papel en el desarrollo de linfomas viene determinado por bloqueo de la apoptosis y la diferenciación. La translocación de *BCL6* es el defecto genético más frecuente en los LBDCG

Durante la última década, los LBAG DH/TH han llamado la atención de los hematólogos y los oncólogos, debido a su pronóstico significativamente peor. Por esta razón, han sido agrupados

en la nueva clasificación de la OMS del 2016. Múltiples estudios han demostrado que la terapia R-CHOP estándar no es adecuada para los pacientes afectados por estas neoplasias, frente la cual muestran altas tasas de resistencia. Sin embargo, actualmente están en marcha estudios e investigaciones de modalidades de terapia dirigida y terapia celular, que en el futuro podrían beneficiar a estos pacientes.

OBJETIVOS

Los objetivos del presente trabajo son principalmente dos:

1. Realizar una revisión bibliográfica con el fin de resumir los criterios diagnósticos actuales, que separan los LBAG DH/TH de los LBDCG como entidades diferentes en la clasificación de la OMS.
2. Preparar el fundamento teórico de un estudio retrospectivo con la casuística de los servicios de Anatomía Patológica del HCU “Lozano Blesa” y del HU “Miguel Servet”, que va a ser el propósito de mi tesis doctoral, cuya finalidad será comprobar la reproducibilidad de estos criterios en la práctica clínica y sus repercusiones en el tratamiento y el pronóstico de los pacientes afectados.

MATERIALES Y MÉTODOS

TIPO DE ESTUDIO

Estudio observacional retrospectivo de una cohorte de pacientes diagnosticados de LBDCG en los hospitales HCU Lozano Blesa y del HU Miguel Servet entre enero de 2005 hasta diciembre de 2015. Se identificarán los pacientes mediante la búsqueda utilizando los códigos SNOMED (109969005) así como texto libre (“linfoma de células grandes”, “linfoma de alto grado”, “linfoma difuso”). De acuerdo a un estudio preliminar se estima una muestra de 400 casos.

En base a la historia clínica se recogerán de forma anonimizada y protocolizada: datos demográficos, fecha del diagnóstico de LBDCG, historia de linfoma previo, estadio Ann Arbor, IPI score, presencia de afectación extraganglionar, régimen de tratamiento, respuesta al tratamiento, supervivencia libre de progresión, fecha de último contacto y estado vital en dicho momento. Se excluirán los pacientes de los que se carezca de material histológico y en aquellos cuyo tratamiento y seguimiento se realice en otros centros.

INMUNOHISTOQUÍMICA

Se reevaluarán las preparaciones histológicas de los pacientes, seleccionando aquellos bloques, ya fijados e incluidos en parafina, más representativos de cada caso. A continuación, se realizarán nuevos cortes histológicos para tinción con HE y también para: CD20, CD10, BCL6, IRPF/MUM1, BCL2, CD5, CD30, MYC, p53 y Ki-67. Se utilizarán los equipos y reactivos empleados en el trabajo rutinario del laboratorio inmunohistoquímico del Servicio de Anatomía Patológica del HCU Lozano Blesa (Dako Autostainer, Dako Antibody Kits). Para todas las inmunotinciones se utilizará tejido de control externo. Para considerar como positivas las técnicas de CD10, BCL6 y IRPF/MUM1 se utilizará un umbral de expresión en al menos 30% de las células tumorales en la muestra y para las BCL2 y MYC en 50% y 40% de las células tumorales respectivamente.[1] Finalmente, dos patólogos de manera independiente confirmarán o descartarán el diagnóstico inicial de LBDCG.

FISH

A continuación, en todos los casos se realizará estudio citogenético de hibridación in situ fluorescente (FISH) con sonda tipo *break-apart*, para la detección de translocación del gen *MYC*. En los casos con resultado positivo se emplearán además sondas *break-apart* de *BCL2* y *BCL6* para evaluar su translocación y completar el perfil citogenético de las neoplasias. Tras

este estudio se van a seleccionar los casos con translocaciones coexistentes de *MYC* y *BCL2* y/o *BCL6* (LBAG doble/triple hit). Según los datos en la literatura, los LBAG doble/triples hits representan el 8-10% de los casos con morfología de LBDCG y por lo tanto se espera recuperar aproximadamente 32-40 casos de esta patología en total [1].

ESTADÍSTICA

Se presentarán las frecuencias absolutas y porcentajes de las variables cualitativas. Para las variables cuantitativas continuas se expresará la media y desviación estándar.

Para comparar las proporciones entre los grupos se utilizará el test de Chi-cuadrado en la comparación de proporciones o el test de Fisher en aquellos casos que el número esperado sea menor a 5. Si corresponde se aportará el riesgo relativo y su intervalo de confianza al 95%.

Para las diferencias de medias se utilizará el test de la T de Student para muestras independientes, una vez comprobado que las muestras sigan una distribución normal por medio del test de Saphiro-Wilk. En caso de no cumplirse las condiciones para el uso de test paramétricos se recurrirá al test de Mann-Whitney.

El análisis de supervivencia se realizará mediante las curvas de Kaplan-Meier, usando el test de log-rank para comparar las diferencias entre grupos. Se considerará la fecha de diagnóstico histológico el punto de partida.

Por último, se realizará un estudio multivariado mediante una regresión de Cox para valorar si la presencia del *doble-hit* es un factor pronóstico independiente de la supervivencia en la enfermedad. En el modelo se incluirán la presencia de doble/triple hit y los factores pronósticos descritos en la literatura: IPI, edad y mutación del gen p53.

Para todos los cálculos anteriores, se considerarán significativa un valor de p inferior a 0,05. Para dichos análisis se utilizará el paquete estadístico SPSS Statistics® v 20.0.

ASPECTOS ÉTICOS

El estudio se realizará cumpliendo la declaración de Helsinki, previa aprobación de los comités éticos de ambos centros.

DISCUSIÓN

En el pasado, el término “Linfoma de alto grado” ha sido utilizado por los patólogos, habitualmente como denominación provisional de linfomas cuyo diagnóstico diferencial incluía LBDCG y LB y que tenían pendientes los estudios genéticos del gen *MYC*. Una vez conocidos los resultados, la neoplasia se clasificaba según los criterios actuales de la OMS. En 2017, la clasificación adoptó la categoría LBAG, dividida en los dos subgrupos LBAG, NOS y LBAG asociado a reordenamientos del *MYC* y *BCL2* y/o *BCL6*. A continuación se revisará y repasará el conocimiento acumulado en los últimos años, que ha llevado a la incorporación de este nuevo tipo de linfomas.

1. LBDCG

El LBDCG es el linfoma no-Hodgkin más frecuente en el mundo, representando el 30-40% de todos los linfomas diagnosticados en los países occidentales. En la última edición de la clasificación de la OMS se define como neoplasia de células B grandes con patrón difuso. “Grande” se define como mayor tamaño que los núcleos de los histiocitos benignos en la misma muestra.

1.1. Etiología

La etiología de los LBDCG es desconocida. La mayoría aparecen de novo (LBDCG primario), pero también se pueden originar de un linfoma de bajo grado (p.ej. leucemia linfática crónica, linfoma folicular, linfoma marginal etc.) y desarrollarse tras la transformación del mismo (LBDCG secundario). La inmunodeficiencia es un factor de riesgo conocido y los LBDCG que ocurren en el contexto de inmunodepresión se suelen asociar a presencia del virus de Epstein-Barr (EBV).

1.2. Epidemiología y presentación clínica

La incidencia de los LBDCG es de 6.3%. Es más prevalente en pacientes en la séptima década de la vida, aunque también se han descrito casos en adultos jóvenes. Es levemente más prevalente en varones.

Clínicamente debuta como masa de rápido crecimiento, afectando a uno o más ganglios linfáticos y/o áreas extranodales (aproximadamente 40% de los pacientes debutan con enfermedad extranodal). [5] Un tercio de los pacientes tiene síntomas B (fiebre, pérdida de peso, sudoración nocturna). Los niveles de LDH y beta-2-microglobulina suelen ser elevados. Aproximadamente la mitad de los pacientes debutan con enfermedad en estadio III-VI de la clasificación de Ann Arbor.

1.3. Morfología

El nombre de la neoplasia describe de forma sencilla y resumida sus rasgos principales – linfocitos B grandes, dispuestos en un patrón difuso, que parcial o totalmente borra la arquitectura del ganglio linfático o la localización extranodal. Se pueden observar tractos de fibrosis finos o escleróticos, así como áreas de necrosis geográfica y frecuentes células apoptóticas. El número de mitosis puede ser elevado. Alrededor del 10% presentan también áreas con patrón de cielo estrellado – rasgo, que se asocia con alto índice proliferativo. Existen 3 variantes citológicas (Fig.1):

- Variante centroblastica (la más común, 80%). Los centroblastos son células grandes que poseen una cantidad de citoplasma moderada, núcleos ovalados con cromatina vesicular y 2-3 nucleolos de disposición periférica, adyacentes a la membrana nuclear.
- Variante inmunoblástica(8-10%): la neoplasia está constituida al menos por un 90% de inmunoblastos. Estos son células grandes, con nucléolo central prominente y finos hilos de cromatina adheridos a la membrana nuclear (“pies de araña”). A veces muestran una llamativa diferenciación plasmocitoide.
- Variante anaplásica (3%): células grandes o muy grandes con núcleos pleomórficos y marcadamente atípicos. Se pueden asemejar a las células de Hodgkin o de Reed-Sternberg.

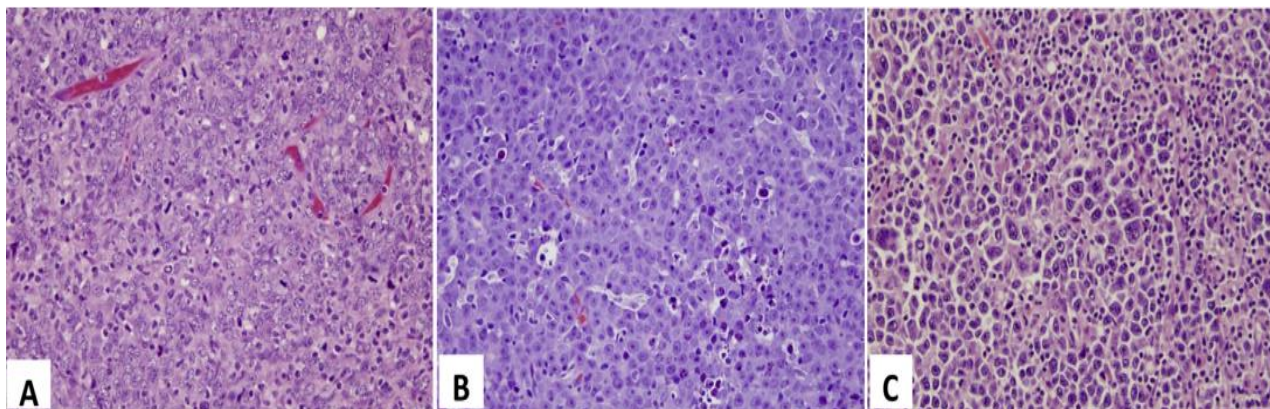


Fig.1 Variantes morfológicas de LBDCG: A) Centrobástico; B) Inmunobástico; C) Anaplásico

1.4. Inmunofenotipo

Para hacer el diagnóstico de LBDCG se requiere evaluación del perfil inmunohistoquímico. Las células expresan marcadores pan-B (CD19, CD20, CD22, PAX5) y 50-70% muestran inmunoglobulinas citoplasmáticas o de superficie (IgM). Hasta un tercio de los LBDCG son negativos para inmunoglobulinas, pero carecen de marcadores de células precursoras (TdT).

Establecer el inmunofenotipo tiene relevancia no solo a la hora del diagnóstico, sino que también tiene valor terapéutico, ya que existen terapias con anticuerpos dirigidos contra CD20, CD19. Un 10-15% son también positivas para CD30, por lo cual terapias anti-CD30 también tienen importancia en el tratamiento de LBDCG.

1.5. Célula de origen

Los LBDCG se originan de la transformación maligna de células B maduras, que están experimentando o que ya han experimentado la reacción centrogerminal. Los centros germinales (CG) son compartimientos microanatómicos dinámicos, que se forman tras la estimulación antigénica de las células B. En ellos tiene lugar su expansión clonal y maduración de la especificidad y afinidad de los anticuerpos. En los CG existen dos zonas anatómica y funcionalmente distintas, entre las cuales constantemente circulan células B. En la *zona oscura* predomina la proliferación de células B (centroblastos), cuyas regiones variables de los genes de inmunoglobulinas (IG) “maduran” a través del proceso de hipermutación somática (SHM), proceso mediado por la enzima Desaminasa Inducida por Activación (Activation Induced

Deaminase, AID). En la *zona clara* se seleccionan las células que sintetizan los anticuerpos con mayor afinidad y especificidad contra el antígeno estimulador (centrocitos) y que se van a diferenciar en células plasmáticas o células de memoria. Simultáneamente, las mismas experimentan la recombinación de cambio de clase (CSR) (Fig.2). El centro germinal es la diana de la transformación maligna en muchos linfomas – las células de los LBDCG albergan genes IG hipermutados y lesiones genéticas debidas a errores en los procesos de remodelación genética propios de los CG.

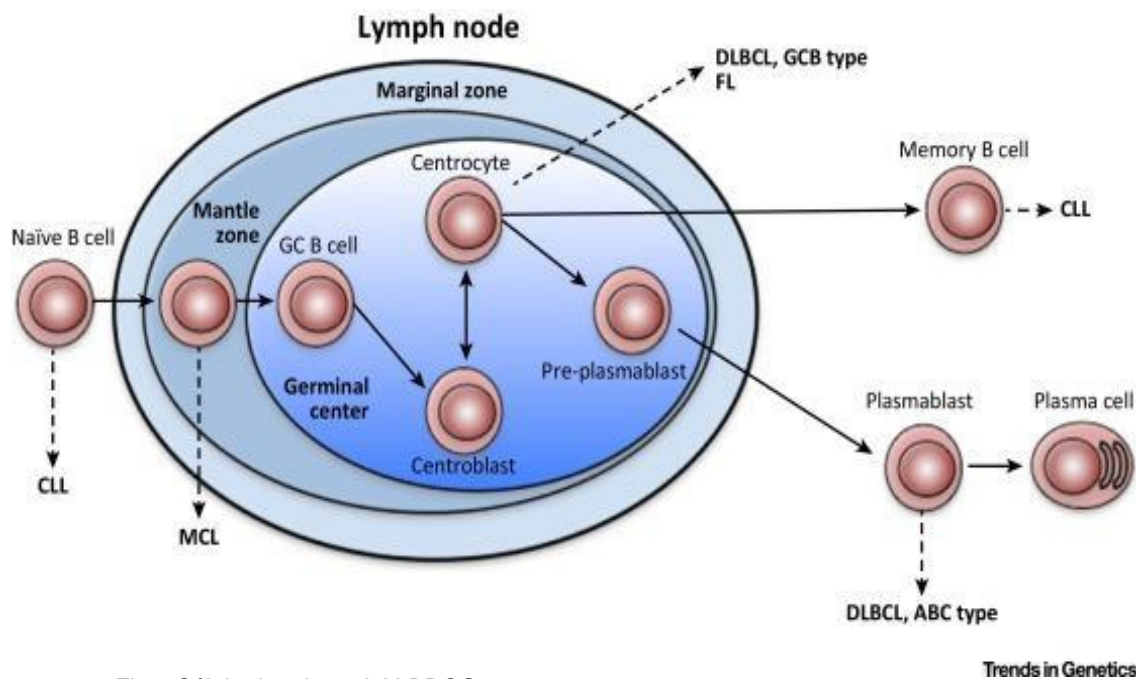


Fig.2 Célula de origen del LBDCG

Alizadeh et al. [6] fueron los primeros en emplear estudios del perfil de expresión genética en los LBDCG. Según la célula de origen, se dividen en Tipo Célula B de Centro Germinal (GCB, 40-50%), Tipo Célula B Activada (ABC, 50-60%) y un pequeño grupo de casos restantes que son de Tipo Inclasificable (10-15%) (en algunas publicaciones los últimos dos se agrupan bajo el denominador “no-GCB”). La división según la célula de origen implica una biología celular fundamentalmente diferente, con perfiles y alteraciones genéticas particulares en cada subtipo. El método “*gold standard*” para determinar la célula de origen son los análisis genéticos. Existen también algoritmos inmunohistoquímicos para distinguir entre los dos subtipos, siendo el más frecuentemente empleado el de Hans, que utiliza las inmunotinciones para CD10, BCL6 y MUM1/IRF4. El punto de corte para considerar cada una de ellas como positiva es expresión

de estos marcadores en más del 30% de las células neoplásicas. El tipo GCB es CD10+ o CD10-/BCL6+/MUM1- , mientras que los no-GCB son CD10-/MUM1+ (el BCL6 puede ser tanto positivo, como negativo). (Fig.3)

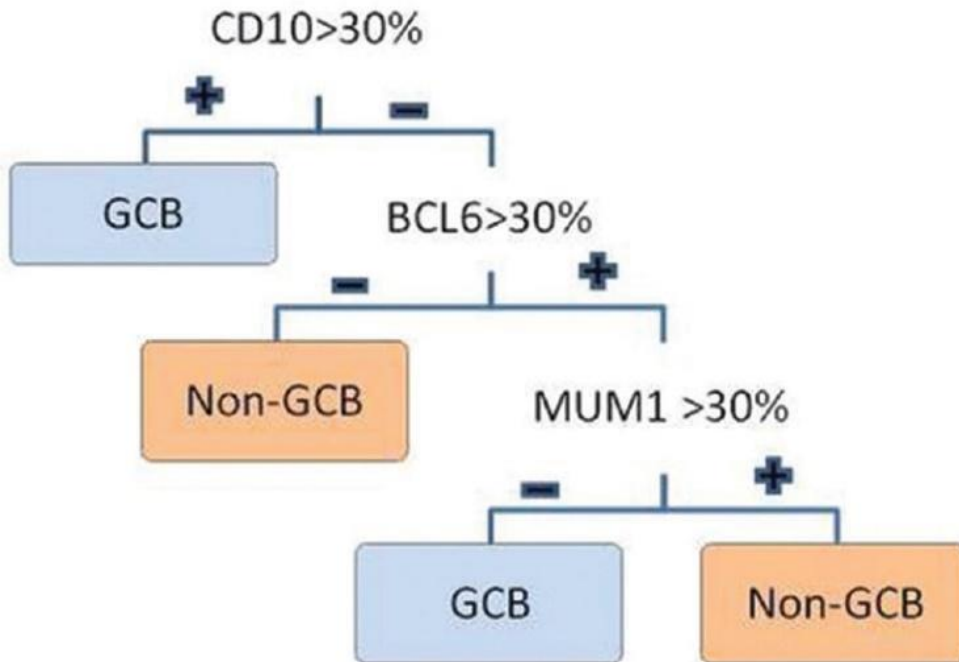


Fig.3 Algoritmo inmunohistoquímico de Hans

1.6. Perfil genético

La patogénesis del LBDCG es un proceso complejo que da lugar a la acumulación de múltiples lesiones genéticas que alteran la estructura y la expresión de diversos protooncogenes y genes supresores de tumores.

1.6.1. Genes del receptor de antígenos

Se pueden detectar reordenamientos clonales de los genes para la cadena pesada (*IGH*) y ligeras (*IGK* y *IGL*) de inmunoglobulina, mientras que el gen del receptor de célula T (TCR) se encuentra en su configuración germinal. En las neoplasias tipo GCB se observa hipermutación somática de la región variable del gen de la cadena pesada en marcha y en las de tipo ABC – rasgos de hipermutación somática previa cumplida.

1.6.2. Alteraciones citogenéticas

En los LBDCG ocurren tres translocaciones cromosómicas principales. A diferencia de lo que ocurre en las leucemias agudas, las translocaciones en el LBDCG no generan proteínas de fusión. Más bien yuxtaponen secuencias reguladoras (promotores o potenciadores) más frecuentemente de los locus de IG con protooncogenes, causando así expresión constitutiva de sus proteínas.

BCL6

Aproximadamente 30% de los casos de LBDCG primarios muestran reordenamientos del cromosoma 3, que afecta al gen *BCL6*, siendo esta la translocación más frecuente en esta neoplasia. Tiende a ocurrir con mayor frecuencia en los subtipos ABC que en los GCB (relación 2:1). En aproximadamente la mitad de los casos, *BCL6* está yuxtapuesto con *IGH* en el cromosoma 14 - t(3;14). Sin embargo el gen *BCL6* es altamente “promiscuo” y puede tener muchos reordenamientos diferentes. *BCL6* es un represor de transcripción que controla genes implicados en la diferenciación y el ciclo celular y es de gran importancia para la correcta realización del programa genético de las células B en los centros germinales. [7]

BCL2

BCL2 es un factor antiapoptótico clave expresado en la mayoría de los tejidos, pero cuya transcripción en los centros germinales está inhibida por *BCL6*, permitiendo así la selección negativa de los linfocitos que no realizan el programa genético B correctamente. La translocación *IGH-BCL2* t(14;18), el sello distintivo del Linfoma folicular, ocurre en aproximadamente 20% de los LBDCG, principalmente en los de subtipo GCB (40%).

MYC

MYC es un oncogén con papel importante en el desarrollo normal de las células B y en la formación del centro germinal. Está expresado en células B estimuladas por antígeno y participa en la proliferación y la diferenciación de estas células en células plasmáticas o células de memoria en los folículos linfáticos secundarios. El gen *MYC* también está involucrado en la patogénesis de linfomas agresivos, como el linfoma de Burkitt, LBDCG, linfoma B inclasificable, linfoma plasmablastico y el linfoma B de célula grande ALK-positivo. Es importante destacar que la mayoría de estos linfomas se originan de células B que no expresan *MYC*, ya que tienen

altos niveles de factores de transcripción como BCL6 y BLIMP1, que son reguladores negativos fisiológicos de MYC. Por lo tanto, la sobreexpresión de MYC en estas neoplasias requiere una importante disregulación oncogénica, que permita la anulación del efecto inhibitor de estos factores de transcripción.

Translocaciones de MYC se observan en 5-10% de los LBDCG y confieren un peor pronóstico a estos pacientes [8]. Estos casos muestran un alto índice proliferativo, inestabilidad genómica (presencia de 3 o más alteraciones citogenéticas concurrentes) y fenotipo “doble expresor” (expresión de proteínas BCL2 y MYC). Los compañeros de translocación más frecuente son los genes *IGH* – t(8;14), *IGL* – t(8;22) y *IGK* – t(2;8). Los puntos de rotura de los genes IG se encuentran en las regiones de la recombinación de cambio de clase (CSR), proceso que ocurre durante la formación de las células plasmáticas en los centros germinales y que está bajo el control de la enzima Deaminasa Inducida por Activación (AID). Se ha comprobado que errores durante el CSR dan lugar a las translocaciones MYC-IG y que esto se asocia más frecuente con el subtipo GCB. [9] Como consecuencia, MYC está yuxtapuesto al potenciador de transcripción de *IGH* o *IGK/L* y por lo tanto está constitutivamente expresado en las células afectadas. En 35-50% de los casos, MYC está reordenado con genes no-IG como *PAX5*, *BCL6*, *BCL11A* entre otros.

Cabe mencionar que aparte de las translocaciones, en 38% y 2% de los LBDCG, respectivamente, se han observado ganancias (3-4 copias) y amplificaciones (5 o más copias) del gen MYC, [10] aunque su relevancia en la pathogénesis todavía no está bien establecida. La disregulación de MYC debido a translocación (tanto con compañero IG, como con genes no-IG) condiciona una tasa de expresión más alta, comparado con alteraciones por otros mecanismos. [11]

	ABC DLBCL	GCB DLBCL
Rearrangements		
BCL2	<5%	40%
BCL6	25-30%	15%
MYC, single hit	5-8%	5-8%

Fig. 4 Frecuencia de las translocaciones de BCL2, BCL6 y MYC según la célula de origen en LBDCG

1.6.3. Otras alteraciones genéticas

Los dos subtipos de LBDCG según la célula de origen – GCB y ABC, albergan diferentes mutaciones genéticas. (Fig.5) Los GCB con frecuencia albergan mutaciones involucradas en la metilación o acetilación de las proteínas histonas y las vías moleculares PI3K y JAK/STAT. En los ABC se observan alteraciones genéticas que activan la vía de señalización del receptor B y de los receptores Toll-like, que finalmente conduce a la activación de la vía NF-κB. [12]

Signalling pathway/process	Gene mutated	DLBCL		
		GCB	ABC	All
BCR/NF-κB	CD79A		Yes (20%)	
	CD79B		Yes (20%)	
	CARD11			10%
PI3K/mTOR/AKT	MYD88		Yes (30%)	
	FOXO1			9%
	GNA13	<20%		
Epigenetic regulation	SGK1	<20%		
	PTEN	40%		
	EZH2	20%		
	MLL2			30%
Immune-regulation Apoptosis	MEF2B	<20%		
	CREBBP			<20%
	EP300			Yes
	TNFRSF14	Yes		
	BCL2	Major	Minor	
	P53			Yes

Fig.5 Perfil mutacional de LBDCG de tipo GCB y de tipo ABC/no-GCB

1.7. Factores pronósticos en LBDCG

El LBDCG es una entidad heterogénea, con múltiples factores que influyen en el pronóstico de esta neoplasia. Parte del abordaje de los pacientes con LBDCG es la estratificación del riesgo de mala o no-respuesta a la terapia estandar y aplicar regímenes de tratamiento más agresivos a estos casos.

1.7.1. International Prognostic Index (IPI) score

Se desarrolló en el año 1994 para identificar casos de LBDCG con peor pronóstico. Incluye 5 variables:

- Edad (<60 años: 0 puntos; >60 años: 1 punto)
- Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) estatus (0 o 1: 0 puntos; 2 – 4: 1 punto)
- Niveles séricos de LDH (dentro de la normalidad: 0 puntos; por encima del umbral: 1 punto)

- Numero de localizaciones de afectación extranodal (0 o 1: 0 puntos; 2 o más: 1 punto)
- Estadío de la enfermedad según la clasificación de Ann Arbor (I/II: 0 puntos; III/IV: 1 punto)

Se forman cuatro grupos de riesgo según el IPI score:

- Bajo (0-1 punto)
- Bajo-intermedio (2 puntos)
- Alto-intermedio (2 puntos)
- Alto-intermedio (3 puntos)
- Alto (4-5 puntos)

1.7.2. Célula de origen

Como se ha mencionado anteriormente, los LBDCG se pueden dividir en dos grupos, realizando estudios del perfil de expresión genética – tipo GCB y tipo ABC (o ABC/no-GCB si se utilizan tinciones inmunohistoquímicas). Dado que este tipo de estudios son difíciles de aplicar en la práctica rutinaria, ya que requieren tejidos en fresco, se han desarrollado algoritmos inmunohistoquímicos para la clasificación rápida de los LBDCG. Varios estudios han comparado pacientes con LBDCG de los dos subtipos y han concluido que el perfil ABC/no-GCB influye negativamente en el pronóstico. [13, 14] No obstante, otros estudios recientes han puesto en duda el papel de la célula de origen como factor pronóstico en estos linfomas. [15] Las recomendaciones actuales de la OMS aconsejan la inclusión de la célula de origen en el diagnóstico anatomopatológico de estas neoplasias. Sin embargo, hay que recordar que la división GCB versus ABC/no-GCB proporciona solo una visión general sobre el pronóstico de los pacientes, ya que ambos grupos son muy heterogéneos y cada uno incluye pacientes con necesidad de abordajes terapéuticos muy diferentes.

1.7.3. Reordenamiento o copias extra de *MYC*

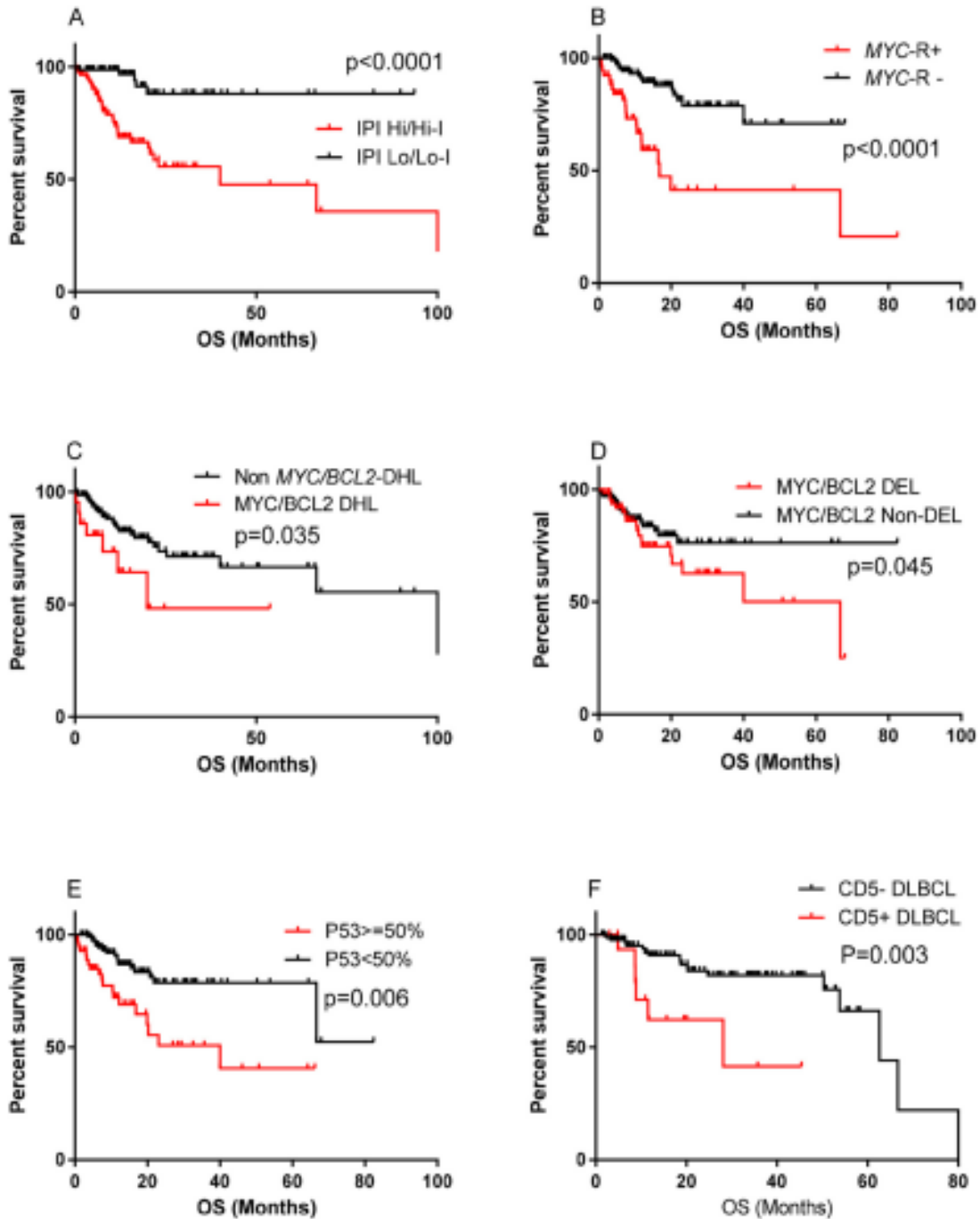
Muchos estudios, aunque no todos, han demostrado que los pacientes en los cuales el LBDCG se asocia a translocación de *MYC* tienen peor pronóstico. Una posible explicación de la discordancia entre los resultados es el compañero de translocación del gen. Se han realizado varios estudios con el fin de determinar si existen diferencias en el pronóstico según el tipo de

translocación de *MYC* (*MYC/IG* versus *MYC/no-IG*). En una serie de 774 casos de LBDCG. [16] se ha comprobado que los reordenamientos *MYC-IG* confiere un pronóstico significativamente peor a los pacientes portadores, mientras no se ha observado diferencia importante en la supervivencia global (SG) y la supervivencia libre de progresión (SLP) entre los casos *MYC-no-IG* y los LBDCG sin reordenamiento de *MYC*. En otra serie de 112 casos de LBDCG con reordenamientos de *MYC* [17], se han comparado la SG y la SLP de pacientes *MYC/IG* versus *MYC/no-IG*, encontrándose resultados similares.

Como se ha mencionado anteriormente, existen casos de LBDCG con copias extras de *MYC*. Su valor pronóstico no está confirmado, aunque algunos estudios recientes han demostrado su influencia negativa. Sin embargo, este efecto parece ser menos fuerte, comparado con el del reordenamiento. [18]

1.7.4. Linfomas Doble Hit (DH)

Los linfomas DH han sido definidos por Aukema et al. [19] como linfomas que albergan reordenamiento de *MYC* y de un segundo oncogen, principalmente *BCL2* o *BCL6*. Existen casos con reordenamientos concomitantes de *MYC*, *BCL2* y *BCL6* y se denominan linfomas Triple Hit (TH). Los LDH/TH representan alrededor de 10% de los casos de LBDCG. El estatus de DH/TH condiciona un curso clínico agresivo y resistencia al tratamiento estándar (R-CHOP) y por lo tanto se asocia con peor pronóstico. Este grupo de linfomas se revisará en detalle más adelante.



Factores pronósticos en LBDCG. A) IPI score; B) Reordenamiento de *MYC*; C) Doble hit *MYC/BCL2*; D) Doble expresión de *MYC* y *BCL2*; E) Sobreexpresión de p53; F) Expresión de CD5

1.7.5. Linfomas Doble Hit atípicos

Existen casos de LBDCG en los cuales se encuentran alteraciones de *MYC* y *BCL2* que podrían ser tanto translocaciones, como amplificaciones. Existen tres grupos:

- Reordenamiento de *MYC* y amplificación de *BCL2*
- Reordenamiento de *BCL2* y amplificación de *MYC*
- Amplificaciones de *MYC* y *BCL2*, sin reordenamientos

Según los resultados del estudio realizado por Li et al. [20], este perfil genético también condiciona peor pronóstico y los autores han propuesto la clasificación de estos casos como linfomas doble hit atípicos.

1.7.6. Linfomas Doble Expresores (LDE)

LDE, también denominado “linfoma doble positivo”, es linfoma difuso de célula grande, en el cual se observa expresión tanto de *MYC*, como de *BCL2*, detectadas con técnicas de inmunohistoquímica. Se necesita demostrar positividad para estos marcadores en al menos 50% de las células para *BCL2* y 40% para *MYC* [1]. Casos de LBDCG doble positivo incluye casos con reordenamientos de *MYC* y *BCL2* (LDH), linfomas doble hit atípicos, pero también neoplasias sin estas alteraciones citogenéticas. Los LDE son mucho más comunes que los LDH y representan 25-30% de los casos de LBDCG. [21] Son también más frecuentes dentro de los LBDCG de subtipo ABC/no-GCB, mientras que los LDH suelen pertenecer al subtipo GCB. Hu et al. han propuesto que la sobreexpresión de *MYC* y *BCL2* podría explicar el peor pronóstico del grupo ABC/no-GCB. (Fig.6) En general, los LDE tienen pronóstico intermedio entre los LBDCG y los LDH. La translocación de *MYC* en los LDE influye negativamente en el pronóstico [22].

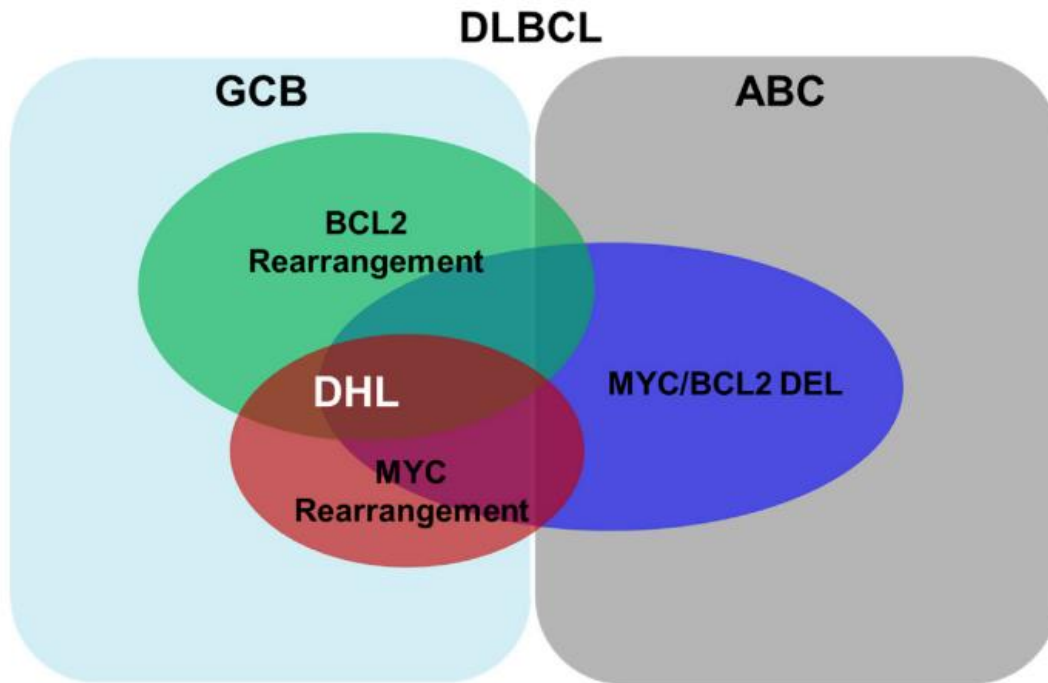


Fig.6 Relación entre los reordenamientos de *MYC* y de *BCL2*, los LDH *MYC/BCL2*, Los LDE y los subtipos GCB versus ABC/no-GCB.

1.7.7. Mutaciones de *TP53* y expresión de p53

TP53 es un gen supresor de tumores involucrado en muchas funciones celulares como la regulación y la detención del ciclo celular, reparación del ADN y la apoptosis. De esta manera, p53 participa en la eliminación de células que han adquirido errores genéticos potencialmente malignos.

Mutaciones de *TP53* ocurren en aproximadamente 20% de los LBDCG y han sido identificados como factores independientes de peor pronóstico. [23] Las mutaciones de *TP53* resultan en la pérdida de la función de su proteína p53 en la mayoría de los casos y pueden afectar al dominio de unión al ADN u otras regiones. Las que ocurren en el dominio de unión al ADN tienen mayor efecto adverso en el pronóstico de estas neoplasias. Las mutaciones de *TP53* ocurren en los LBDCG tipo GCB y ABC/no-GCB con frecuencias aproximadamente iguales. También se detectan en un tercio de los LDH *MYC/BCL2*, pero son infrecuentes en los LDH *MYC/BCL6*.

La proteína p53 mutada tiene una vida media más larga que la proteína nativa. Por lo tanto se acumula en el citoplasma y se puede detectar inmunohistoquímicamente como sobreexpresión de p53 en las células afectadas. Se ha comprobado que la sobreexpresión de p53 en más del 50% de las células guarda cierta correlación con la mutación del gen *TP53* y es factor de peor pronóstico en los pacientes con LBDCG. [24] La mutación y la sobreexpresión de p53 también potencia el efecto oncogénico del reordenamiento de *MYC*. Algunos autores han llegado a considerar la combinación de translocación de *MYC* y mutación de *TP53* como otra forma de LDH. [25]

1.7.8. LBDCG CD5+

CD5 normalmente se expresa en linfocitos T y una población diminuta de células B en sangre periférica y en la zona del manto de los folículos linfoides. Expresión aberrante de CD5 es característica de dos neoplasias de células B – leucemia linfática crónica/linfoma de linfocitos pequeños (LLC/SLL) y linfoma del manto (MCL), pero también ocurre en 5-10% de los LBDCG. CD5 aumenta la supervivencia de las células B a través de la producción autocrina de interleucina-10, movilización y modulación del calcio intracelular y activación de vías de señalización como PI3K.

Pacientes con LBDCG CD5+ muestran características clinicopatológicas asociadas con agresividad: edad avanzada, afectación extranodal, enfermedad en estadios avanzados al diagnóstico, niveles altos de LDH y alto IPI score. Las neoplasias suelen ser tipo ABC/no-GCB y cariotipo complejo. Estos pacientes tienen baja supervivencia cuando han sido tratados con CHOP o R-CHOP, que no mejora al aplicarles regímenes de terapia más agresivos.[26]

Por estas razones la OMS recomienda evaluación de la expresión de CD5 en todos los casos de LBDCG, haciendo hincapié en la importancia de diferenciarlos de LLC/SLL en transformación (Sd de Richter).

1.8. Tratamiento

La terapia estándar para los pacientes con LBDCG consiste en el régimen R-CHOP (Rituximab, Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine, Prednisone). Con esta terapia se pueden curar 60-70% de los pacientes. Sin embargo, 30-40% de ellos recaen y en un pequeño porcentaje

son incluso refractarios al tratamiento con R-CHOP. En pacientes jóvenes se puede considerar el trasplante de células madres hematopoyéticas.

La investigación sobre el tratamiento de LBDCG se realiza en dos direcciones principales. La primera es encontrar opciones de tratamiento menos tóxicas o regímenes de dosis más bajas para los pacientes que responden bien a la terapia R-CHOP. Para los casos de fracaso terapéutico, en primer lugar se está buscando estrategia para identificarlos y aplicarles tratamientos más agresivos como el régimen R-EPOCH (Rituximab, Etoposide, Prednisone, Vincristine, Cyclophosphamide, Doxorubicine) y en segundo – desarrollar nuevos agentes más efectivos, utilizan el conocimiento acumulado sobre los mecanismos patogénicos del LBDCG.

2. LINFOMAS B DE ALGO GRADO (LBAG)

Un 10% de los casos de LBDCG presentan rasgos morfológicos de agresividad, que suponen un peor pronóstico para los pacientes. Entre ellos destacan un patrón de cielo estrellado (“starry sky”), una mezcla de células medianas y otras de tamaño grande y un alto índice mitótico y proliferativo (Ki-67). Algunas de estas características se observan también en el LB. Estas neoplasias de la zona “gris” han sido denominadas como linfomas B inclasificables (LBI) con rasgos intermedios entre LBDCG y LB en la penúltima edición de la clasificación de las neoplasias de los tejidos hematopoyéticos y linfoides de la OMS del año 2008. En la última edición del año 2016, este grupo ha sido reemplazado por los linfomas B de alto grado, a base de los recientes desarrollos de las tecnologías de investigación y la expansión del conocimiento sobre la base genética y molecular de estas neoplasias. Los LBAG se dividen en dos grupos principales: LBAG, NOS y LBAG DH/TH.

2.1. LBAG, NOS

Los LBAG sin otras especificaciones (LBAG, NOS) equivalen a los LBI, excluyendo los linfomas con reordenamientos de *MYC/BCL2* y/o *BCL6*. El diagnóstico está basado en criterios patológicos. Dentro de los LBAG, NOS se reconocen tres subtipos morfológicos.

- El primero presenta los rasgos morfológicos de los LBI, descritos anteriormente: patrón difuso, en cielo estrellado con alto índice proliferativo. Las células presentan variabilidad del tamaño y las características nucleares son intermedias entre LBDCG y LB.
- El segundo es morfológica e inmunohistoquímicamente equiparable al LB, salvo a la expresión de BCL2 y cariotipo complejo.
- El tercero, el menos frecuente, presenta núcleos blastoides, parecidos a los de las células del linfoma linfoblástico, del cual se diferencia por la negatividad de marcadores de células inmaduras (TdT, CD34).

Inmunofenóticamente, LBAG, NOS expresa marcadores B (CD19, CD20, CD79a), pueden ser positivo o negativo para BCL2 y habitualmente positivos para MYC. El índice proliferativo suele ser alto (>90%). Más frecuentemente son de tipo GCB, pero también existen casos no-GCB/ABC. A nivel molecular, pueden existir reordenamientos aislados (“Single Hit”, SH) de *MYC* (20-30%), *BCL2* o *BCL6* y también ganancias o amplificaciones de estos genes.

2.2. LBAG con reordenamientos de *MYC*, *BCL2* y/o *BCL6*

El segundo grupo principal, LBAG con reordenamientos de *MYC*, *BCL2* y/o *BCL6* (LDH/TH), es definido genéticamente, según la nueva clasificación de la OMS. Los más frecuentes son los LDH *MYC/BCL2* (65%), seguidos de los LTH *MYC/BCL2/BCL6* (20%) y los LDH *MYC/BCL6*. Pueden tener los tres patrones morfológicos del LBAG, NOS, pero también el de LBDCG. (Fig.7) Dado que el LBDCG es el tipo de linfoma más frecuente y según estudios previos [27] alrededor de 10% de los LBDCG albergan DH o TH, esto hace el LBDCG el tipo histológico más frecuente en este grupo.

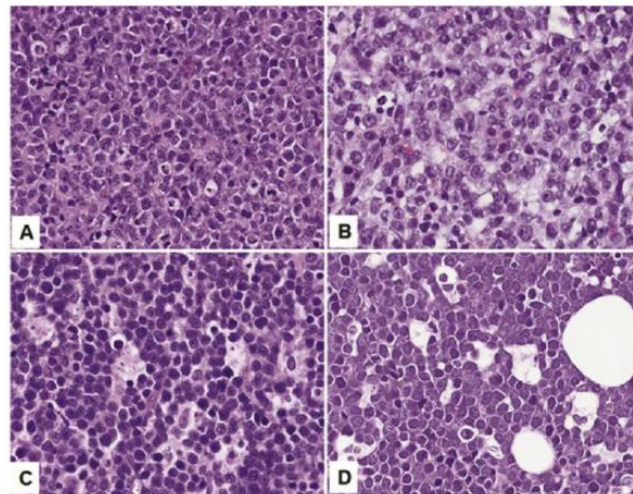


Fig.7 Los cuatro patrones morfológicos de los LBAG Doble/Triple Hit: A. LBI; B. LBDCG; C. LB; D. LBAG con rasgos blastoides

2.2.1 LDH *MYC/BCL2*

2.2.1.1 Características clínicas

Las pruebas citogenéticas aplicadas rutinariamente a todos los linfomas B agresivos en los últimos años han demostrado que su prevalencia no es tan baja, como se suponía en el pasado. Muchos estudios recientes de cohortes amplias afirman que los LDH *MYC/BCL2* representan alrededor del 10% de los linfomas B

Fig. 8. Características clinicopatológicas de los pacientes con linfoma doble/triple hit en los estudios de series grandes, realizados en los últimos 10 años.

References	Number of cases	Age median (range)	Gender (% of Male)	History of low grade B-cell lymphoma (%)	Stage III/IV (%)	Elevated LDH (%)	BM+ (%)	CNS+ (%)	Extranodal sites> 1 (%)	IPI H-I/ H (%)	GCB (%)	DLBCL% MYC/ BCL2 DEL%	Overall survival
MYC/BCL2 DHL (n > 100)													
Petrich et al. (2014)	270/311	60 (19–87)	60	22	81	76	44	11	28		87	(181/ 208)	50
22 months													
Okí et al. (2014)	93/129	62 (17–84)	65	11	84	69	42	10	49	87	93	84	18 months
Li et al. (2016)	157	61 (18–87)	66	31	87	84	50	18	54	82	99	61	19 months
MYC/BCL6 DHL													
Pillai et al. (2013)	6	83 (51–89)	50		67				50	25 (1/ 4)	83	17	9 months
Turakhia et al. (2014)	6	63 (56–76)	0				0 (0/4)				83	67	13 (1/6)
Aukema et al. (2014)	14	68	29	7							50	100	Worse than BCL2 DHL
Landsburg et al. (2015)	16	>60 years in 56%			75	56	47 (7/15)	18 (2/11)		44	56	56	Similar to MYC/BCL2 DHL & THL
Li et al. (2016)	13	63 (34–86)	62	8	82	67	36	50	82	80	75	85	Similar (17 months) to MYC/BCL2 DHL
Ye et al. (2016)	14	>60 years in 69%		0	58	69			36	50	64	Only DLBCL included	See text
THL													
Tomita et al. (2009)	7	61 (44–71)	57		83	100	67		50	100			Worse (4 months) than DHL
Bacher et al. (2011)	10	69 (47–82)	70	20							100	20	11 months
Aukema et al. (2014)	6		33	0							82 (14/ 17)	67	Similar to DHL
Landsburg et al. (2015)	25	>60 years in 44%			76	44	43 (10/23)	13 (2/16)		68	82 (14/ 17)	48	Similar (17 months) to DHL
Wang et al. (2015)	11	64 (45–80)	100	40 (4/10)	90	89	73			100	100	50 (5/10)	90 (9/10)
Huang et al. (2018)	40	61 (34–85)	63	23	89	77	56	18	70	81	98	58	71 (22/ 31)

[27, 28, 29] La edad media de los pacientes es 60 años, siendo muy infrecuente este tumor en pacientes jóvenes. La mayoría son primarios, aunque 20-30% originan de la transformación de un linfoma B de bajo grado, típicamente linfoma folicular. Más del 80% de los pacientes debutan con enfermedad en estadios avanzados (III/IV), alto IPI score, niveles séricos de LDH elevados y frecuente afectación extranodal. Comparados con LBDCG, los casos de LDH MYC/BCL2 con mayor frecuencia presentan afectación extranodal (SNC, médula ósea), LDH elevado y alto IPI score. (Fig.8)

2.2.1.2. Inmunofenotipo

Las neoplasias muestran expresión de marcadores B y frecuentemente expresión de cadenas ligeras de superficie. La práctica totalidad de casos pertenecen al subtipo GCB. En más del 90% expresan CD10 y BCL2, y la mayoría son también positivos para BCL6. En hasta 70% se observa doble expresión de MYC y BCL2. [4]

2.2.1.3 Alteraciones citogenéticas

LDH MYC/BCL2 son definidos por los reordenamientos concomitantes de MYC y BCL2, detectados con FISH o realizando cariotipo convencional. La primera es la técnica más frecuentemente empleada, dado que se puede aplicar a muestras de tejidos en parafina fijados en formol.

El gen MYC más frecuentemente está yuxtapuesto con el gen de *IGH*, pero podría estar reordenado con diferentes genes y la sonda tipo break-apart tiene la mayor sensibilidad para detectar la translocación, aunque no puede identificar el compañero de translocación exacto. Para conseguirlo, es necesario emplear sondas de tipo dual-fusion. Se ha comprobado que los reordenamientos principales ocurren con los genes de las inmunoglobulinas (*IGH*, *IGK*, *IGL*), pero en hasta 50% de los LDH MYC/BCL2 puede estar reordenado con genes no-IG – *BCL6*, *BCL11A*, *PAX5* etc. De hecho, las frecuencias de los diferentes compañeros de translocación de MYC no varían significativamente dentro del LBAG con reordenamientos de MYC, BCL2 y/o BCL6. (Fig. 9) [17]

	Total breakpoints	IGH partner	IGK/IGL partner	Non-IG partner
Genic cluster	35	28 (80)	0 (0)	7 (20)
Other	70	7 (10)	8 (11)	55 (79)
Single-hit	34	14 (41)	3 (9)	17 (50)
HGBL-DH	69	19 (28)	5 (7)	45 (65)
GCB	71	19 (27)	6 (8)	46 (65)
ABC/non-GCB	25	11 (44)	2 (8)	12 (48)

Fig. 9 Frecuencia de los diferentes compañeros de translocación de MYC en los LDH *MYC/BCL2*. [17]

La translocación t(14;18) yuxtapone el gen *BCL2* con el gen *IGH*, condicionando así la sobreexpresión de *BCL2*. La sobreexpresión de *BCL2* inhibe la proteína Ku e impide la reparación del ADN causada por las enzimas RAG1/2 y AID durante la recombinación somática y la recombinación de cambio de clase. [19] En condiciones fisiológicas la proliferación y la apoptosis están estrictamente reguladas y balanceadas. En los linfomas con reordenamientos de *MYC* y *BCL2*, la translocación de *MYC* y su sobreexpresión aumentan la proliferación, mientras la translocación y sobreexpresión de *BCL2* inhiben la apoptosis, dando lugar a una neoplasia de crecimiento rápido. Algunos autores proponen que esta inestabilidad genómica inducida por la sobreexpresión de *BCL2* podría participar en el origen del cariotipo complejo de estos tumores y que también podría facilitar el segundo hit: la translocación secundaria del gen *MYC*, teoría respaldada por el frecuente reordenamiento de *MYC* con genes de las cadenas ligeras de las IG y genes no-IG.

2.2.2 LDH *MYC/BCL6*

Los LDH con reordenamientos de *MYC* y *BCL6* representan 15% de los linfomas Doble/Triple Hit. Estudios comparativos de DHL *MYC/BCL2* y LDH *MYC/BCL6* han encontrado muchas similitudes en el perfil clinicopatológico de estos pacientes. (Fig. 8) Las diferencias destacables incluyen un mayor porcentaje de casos de subtipo no-GCB/ABC y morfología de LBDCG. No se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en las frecuencias de recombinaciones genéticas (IG versus no-IG) entre los LDH *MYC/BCL2* y *MYC/BCL6*. [30]

La práctica totalidad de los estudios afirman que los LDH *MYC/BCL6* tienen mal pronóstico, similar al de los LDH *MYC/BCL2*. (Fig.10) [30, 31]

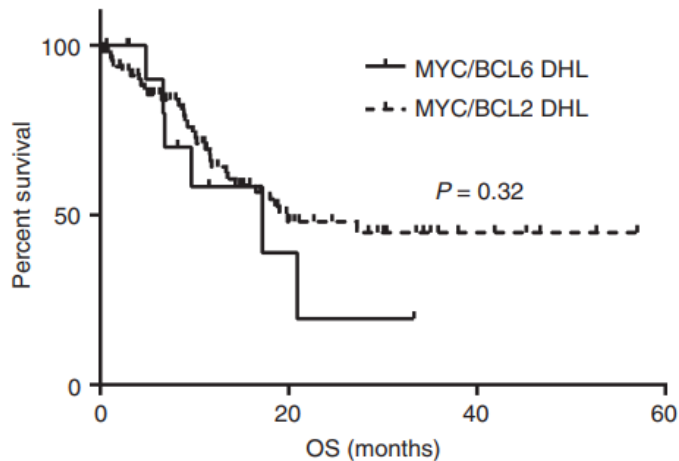


Fig. 10 Comparación de la supervivencia global (OS). No se ha encontrado diferencia estadísticamente significativa en la supervivencia global entre pacientes con LDH *MYC/BCL6* (n=13) y LDH *MYC/BCL2* (n=83) (p=0.32)

Sin embargo, los autores de un estudio no consiguieron encontrar diferencias significativas en la supervivencia global entre casos de LBDCG con doble hit *MYC/BCL6* versus casos sin doble hit. La tendencia general es considerar el perfil de doble hit *MYC/BCL6* como factor de peor pronóstico, aunque se necesitan más datos.

2.2.3 LTH *MYC/BCL2/BCL6*

Los LTH representan 20% de los casos LDH/TH y por tanto son el subgrupo menos frecuente y por lo tanto los datos sobre este linfoma son escasos. En los pocos estudios encontrados, se observa una gran similitud clinicopatológica (Fig.8), morfológica e inmunofenotípica entre los LTH y los LDH *MYC/BCL2*. Recientemente Huang et al. publicó el estudio más grande sobre LTH, comparando 40 casos de este linfoma con 157 casos de LDH *MYC/BCL2* y 13 casos de LDH *MYC/BCL6*. [31] Es el único estudio hasta el momento, que ha investigado los factores pronósticos en los LTH y ha identificado la expresión de p53 y la edad avanzada como tales.

2.2.4 DIAGNOSTICO

El diagnóstico para todos los LDH/TH es similar. En el contexto de un linfoma agresivo de patrón difuso es necesario demostrar la coexistencia de translocaciones de *MYC* y *BCL2* y/o *BCL6* mediante FISH o cariotipo en el contexto morfológico adecuado. (Fig.11) Sin embargo, aquí aparece una cuestión que puede complicar el proceso diagnóstico. Se debe realizar estudio citogenético para las translocaciones rutinariamente en todos los casos de LBDCG? Existe alguna manera de cribar los casos a los cuales aplicar este estudio? Utilizando 40%

como umbral para la expresión inmunohistoquímica de *MYC* se consigue una sensibilidad de 81% y especificidad de 61% para la predicción de la translocación de *MYC*. [22] Realizando FISH solo en los casos de tipo GCB reducirá los casos que lo necesitan a 50%, pero se perderá un grupo de LDH/TH importante, especialmente LDH *MYC/BCL6*. Un estudio reciente estudio ha demostrado que

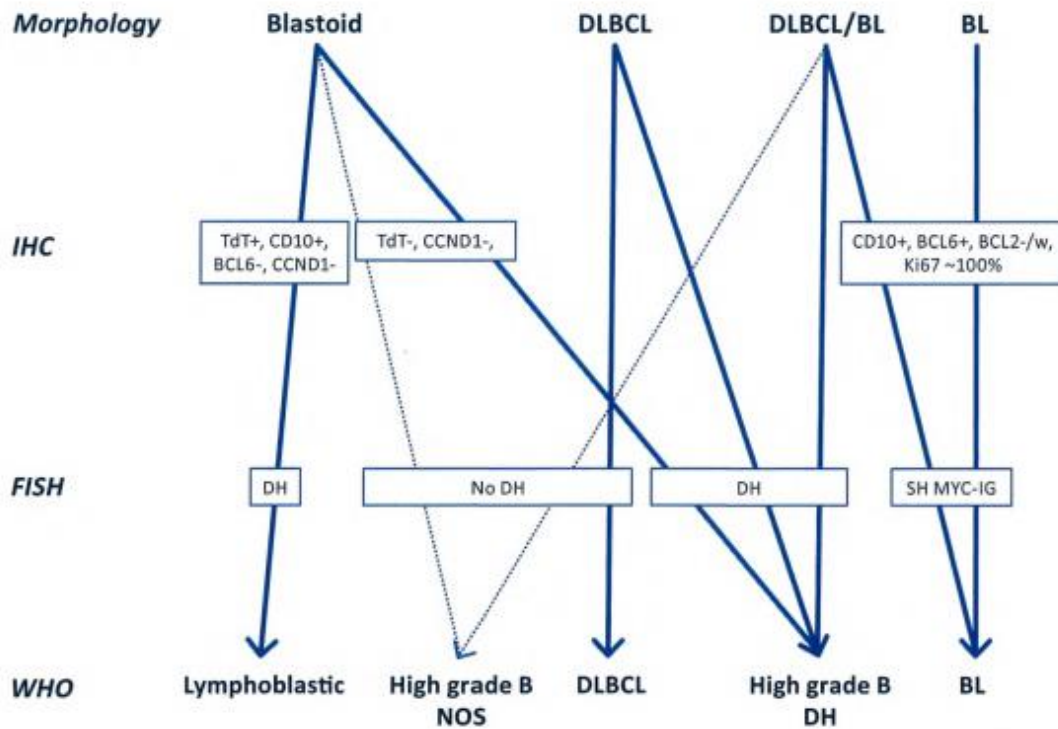


Fig.11 Diagnóstico de LBAG DH/TH según la morfología

utilizando la combinación de doble expresión de *MYC* y *BCL2* y el fenotipo GCB como cribado, limitara la necesidad de FISH a 15%, pero 35% de los LDH/TH no van a ser detectados. [32] Los autores han concluido que se debería hacer FISH para *MYC* a todos los casos con morfología de LBDCG y blastoide y solo en caso de que es positivo seguir con estudios para *BCL2* y *BCL6*. (Fig.12)

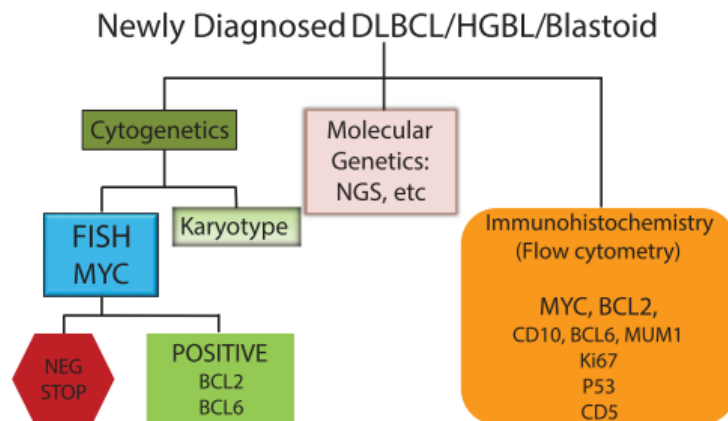


Fig.12 Algoritmo recomendado para la aproximación diagnóstica a los casos de LBDCG y LBAG para detectar los LDH/TH

2.2.5 PRONÓSTICO

Los LBAG con translocaciones de MYC, *BCL2* y/o *BCL6* han llamado la atención de los hematólogos en los últimos 10 años debido a su pronóstico nefáusto. Por la misma razón han sido agrupados y separados en una nueva categoría en la última edición de la clasificación de la OMS.

Múltiples estudios han demostrado que la terapia R-CHOP estándar no es efectiva en los pacientes con LDH/TH. En el estudio de Petrich et al. sobre 311 casos sin tratamiento previo demuestra que regímenes de inducción intensiva, como Hyper-CVAD, DA-EPOCH-R y R-CODOX, aumentan significativamente la supervivencia libre de progresión, pero no la supervivencia global. [35] En otro estudio de MD Anderson Cancer Center con 93 pacientes, el régimen de inducción R-EPOCH aumenta la tasa de remisiones completas, la supervivencia libre de progresión y la supervivencia global, comparado con R-CHOP. En ambos estudios, el trasplante de células madre hematopoyéticas tras la primera remisión completa no ha conseguido aumentar las supervivencia de estos pacientes. Todo esto ha sido demostrado en un tercer estudio multicéntrico con 159 pacientes [33] Aunque todavía no existe esquema terapéutico estándar para los LDH/TH, está aceptado y recomendado en las guías de NCCN el empleo de terapias de inducción intensiva (especialmente DA-EPOCH-R) en estos casos. [34]

A pesar de todas las opciones estudiadas, la supervivencia de los pacientes con LBAG DH/TH es baja – la mediana más larga ha sido de 2 años. Sin embargo, esto no es válido para todos

los pacientes. En el estudio de Petrich [35] mencionado anteriormente, aproximadamente 7% de los 311 pacientes, no tenían ninguno de los cuatro factores de mal pronóstico estudiados (Estadio III/IV, LDH más de 3 veces por encima del límite normal, afectación del SNC y leucocitosis) y mostraron muy buena supervivencia a largo plazo (90%). Diferentes estudios han explorado los factores pronósticos en los LDH/TH. (Fig.13) En general, el IPI score, el estadio de Ann Arbor, los niveles de LDH y la mutación de TP53 y han sido establecidos como factores pronósticos en los LBAG doble/triple hit.

References	Type	Univariate analysis	Multivariate analysis
Petrich et al. (2014)	Analyzed all together (n = 311: 270 MYC/BCL2 DHL, 16 MYC/BCL6 DHL and 25 THL)	Age > 60 years, ECOG PS: 2–4, leukocytosis, hypoalbuminemia, LDH, B-symptoms, > 1 E sites of involvement, advanced Ann Arbor stage, BM involvement and CNS involvement were poor prognostic factors for OS; <i>while morphology, history of NHL/FL, type of DHL or THL and cell of origin were not associated with OS</i>	Advanced stage, CNS involvement, leukocytosis, and LDH > 3 times were associated with shorter OS
Landsburg et al. (2015)	MYC/BCL2 DHL (n = 76) MYC/BCL6 DHL (n = 16) THL (n = 25)	MYC/BCL2 DHL: IPI ≥ 3, LDH, advanced Ann Arbor stage(III/IV), BM lymphoma; THL: IPI ≥ 3 and BM lymphoma. Above were inferior factors significantly associated with death	No factor remained statistically significant on multivariate analysis (Likely related to the relatively small number of cases)
Li et al. (2016)	MYC/BCL2 DHL (n = 157)	IPI high or intermediate-high, advanced Ann Arbor stage(III/IV), BM and CNS involvement were poor prognostic factors for OS; CR and SCT (any time point) were superior prognostic factors; <i>while morphology, history of FL/NHL, MYC, BCL2, or MYC/BCL2 coexpression and MYC partner were not associated with OS</i>	IPI high or intermediate-high and advanced Ann Arbor stage(III/IV) were poor prognostic factors for OS; CR and SCT (any time point) were superior prognostic factors for OS
Huang et al. (2018)	THL (n = 40)	Age ≥ 60 years and p53 ≥ 50% by immunohistochemistry are poor prognostic factors for OS	Not performed due to number of cases

Fig.13 Factores pronósticos en los linfomas doble/triple hit

CONCLUSIONES

1. Los LBAG, NOS y LBAG con reordenamientos de *MYC* y *BCL2* y/o *BCL6* (LDH/TH) son dos categorías nuevas incluidas en la clasificación de los tumores de los tejidos hematopoyéticos y linfoides de la OMS del año 2016.
2. Los estudios hasta el momento han demostrado que todos los pacientes con LDH *MYC/BCL2*, LDH *MYC/BCL6* y LTH tienen un pronóstico similar, siendo este desfavorable.
3. Los LDH/TH son definidos por sus translocaciones genéticas y morfológicamente muestran patrones de LBDCG y LBI, y menos frecuentemente de LB o blastoide.
4. Los LDH/TH y los LDE no son equiparables. Los LDH/TH son mucho menos frecuentes de los LDE, representando cada uno de ellos 10% y 30% de los LBDCG, respectivamente. La mayoría de los LDH/TH son LDE, pero la mayoría de los LDE no son LDH/TH. La mayoría de los LDH/TH son de subtipo GCB, mientras que la mayoría de los LDE son de subtipo ABC.
5. El IPI score, los niveles de LDH y la mutación de *TP53* son factores de mal pronóstico establecidos. El papel del gen compañero de translocación de *MYC* y la doble expresión de *MYC* y *BCL2* como factores pronósticos necesita estudios adicionales.
6. Aplicando FISH a un grupo de pacientes con LBDCG según diferentes criterios de cribado, limitará la necesidad de este estudio. Sin embargo, se perderá un número de casos considerable. Dada la alta tasa de resistencia al tratamiento en los LDH/TH y el precio del tratamiento, se recomienda el estudio FISH escalonado en todos los casos de LBDCG.
7. Aunque todavía no existe terapia estándar, se considera que el régimen de inducción R-EPOCH es más efectivo, frente al tratamiento con R-CHOP.

BIBLIOGRAFÍA

1. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. ed. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Revised 4th. Lyon: IARC; 2017.
2. Coiffier B, Sarkozy C. Diffuse large B-cell lymphoma: R-CHOP failure-what to do? Hematology am Soc Hematol Educ program. Hum Pathol. 2016;52:198–200. doi: 10.1016/j.humpath.2015.12.032.
3. Johnson NA, Slack GW, Savage KJ, Connors JM, Ben-Neriah S, Rogic S, Scott DW, Tan KL, Steidl C, Sehn LH, et al. Concurrent expression of MYC and BCL2 in diffuse large B-cell lymphoma treated with ituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone. J Clin Oncol. 2012;30(28):3452–3459. doi: 10.1200/JCO.2011.41.0985.
4. Green TM, Young KH, Visco C, Xu-Monette ZY, Orazi A, Go RS, Nielsen O, Gadeberg OV, Mourits-Andersen T, Frederiksen M, Pedersen LM, Møller MB. Immunohistochemical Double-Hit Score Is a Strong Predictor of Outcome in Patients With Diffuse Large B-Cell Lymphoma Treated With Rituximab Plus Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine, and Prednisone. J Clin Oncol. 2012;30:3460–7.
5. Martelli, M., Ferreri, A. J., Agostinelli, C., Di Rocco, A., Pfreundschuh, M., & Pileri, S. A. (2013). Diffuse large B-cell lymphoma. *Critical reviews in oncology/hematology*, 87(2), 146-171.
6. Alizadeh, A. A., Eisen, M. B., Davis, R. E., Ma, C., Lossos, I. S., Rosenwald, A., ... & Powell, J. I. (2000). Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*, 403(6769), 503.
7. Iqbal, J., Greiner, T. C., Patel, K., Dave, B. J., Smith, L., Ji, J., ... & Horsman, D. E. (2007). Distinctive patterns of BCL6 molecular alterations and their functional consequences in different subgroups of diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia*, 21(11), 2332.
8. Barrans, S., Crouch, S., Smith, A., Turner, K., Owen, R., Patmore, R., ... & Jack, A. (2010). Rearrangement of MYC is associated with poor prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated in the era of rituximab. *Journal of clinical oncology*, 28(20), 3360-3365.
9. Ramiro, A. R., Jankovic, M., Eisenreich, T., Difilippantonio, S., Chen-Kiang, S., Muramatsu, M., ... & Nussenzweig, M. C. (2004). AID is required for c-myc/IgH chromosome translocations in vivo. *Cell*, 118(4), 431-438.
10. Valera Barros, A., López Guillermo, A., Cardesa Salzmán, A., Climent, F., González Barca, E., Mercadal, S., ... & Salamero, O. (2013). MYC protein expression and genetic alterations have prognostic impact in diffuse large B-cell lymphoma treated with immunochemotherapy. *Haematologica*, 2013, vol. 98, num. 10, p. 1554-1562.
11. Bertrand, P., Bastard, C., Maingonnat, C., Jardin, F., Maisonneuve, C., Courel, M. N., ... & Tilly, H. (2007). Mapping of MYC breakpoints in 8q24 rearrangements involving non-immunoglobulin partners in B-cell lymphomas. *Leukemia*, 21(3), 515.
12. Morin, R. D., Mungall, K., Pleasance, E., Mungall, A. J., Goya, R., Huff, R., ... & Corbett, R. D. (2013). Mutational and structural analysis of diffuse large B-cell lymphoma using whole genome sequencing. *Blood*, blood-2013.
13. Barrans, S., Crouch, S., Smith, A., Turner, K., Owen, R., Patmore, R., ... & Jack, A. (2010). Rearrangement of MYC is associated with poor prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated in the era of rituximab. *Journal of clinical oncology*, 28(20), 3360-3365.

14. Pasqualucci, L., Trifonov, V., Fabbri, G., Ma, J., Rossi, D., Chiarenza, A., ... & Chan, J. (2011). Analysis of the coding genome of diffuse large B-cell lymphoma. *Nature genetics*, 43(9), 830.
15. Schmidt-Hansen, M., Berendse, S., Marafioti, T., & McNamara, C. (2017). Does cell-of-origin or MYC, BCL2 or BCL6 translocation status provide prognostic information beyond the International Prognostic Index score in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab and chemotherapy? A systematic review. *Leukemia & lymphoma*, 58(10), 2403-2418.
16. Copie-Bergman, C., Cuillière-Dartigues, P., Baia, M., Briere, J., Delarue, R., Canioni, D., ... & Recher, C. (2015). MYC-IG rearrangements are negative predictors of survival in DLBCL patients treated with immunochemotherapy: a GELA/LYSA study. *Blood*, blood-2015.
17. Chong, L., Ben-Neriah, S., Slack, G. W., Ennishi, D., Mottok, A., Collinge, B., ... & Gerrie, A. S. (2017). High-Resolution Architecture and Partner Genes of MYC Rearrangements in Lymphoma with DLBCL Morphology.
18. Quesada, A. E., Medeiros, L. J., Desai, P. A., Lin, P., Westin, J. R., Hawsawi, H. M., ... & Yin, C. C. (2017). Increased MYC copy number is an independent prognostic factor in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Modern Pathology*, 30(12), 1688.
19. Aukema, S. M., Siebert, R., Schuurin, E. D., van Imhoff, G. W., Kluin-Nelemans, H. C., Boerma, E. J., & Kluin, P. M. (2011). Double-hit B-cell lymphomas. *Blood*, 117(8), 2319-2331.
20. Li, S., Seegmiller, A. C., Lin, P., Wang, X. J., Miranda, R. N., Bhagavathi, S., & Medeiros, L. J. (2015). B-cell lymphomas with concurrent MYC and BCL2 abnormalities other than translocations behave similarly to MYC/BCL2 double-hit lymphomas. *Modern pathology*, 28(2), 208.
21. Hu, S., Xu-Monette, Z. Y., Tzankov, A., Green, T., Wu, L., Balasubramanyam, A., ... & Montes-Moreno, S. (2013). MYC/BCL2 protein co-expression contributes to the inferior survival of activated B-cell subtype of diffuse large B-cell lymphoma and demonstrates high-risk gene expression signatures: a report from The International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program Study. *Blood*, blood-2012.
22. Wang, X. J., Medeiros, L. J., Lin, P., Yin, C. C., Hu, S., Thompson, M. A., & Li, S. (2015). MYC cytogenetic status correlates with expression and has prognostic significance in patients with MYC/BCL2 protein double-positive diffuse large B-cell lymphoma. *The American journal of surgical pathology*, 39(9), 1250-1258.
23. Young, K. H., Weisenburger, D. D., Dave, B. J., Smith, L., Sanger, W., Iqbal, J., ... & Rimsza, L. (2007). Mutations in the DNA-binding codons of TP53, which are associated with decreased expression of TRAILreceptor-2, predict for poor survival in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*, 110(13), 4396-4405.
24. Xie, Y., Bulbul, M. A., Ji, L., Inouye, C. M., Groshen, S. G., Tulpule, A., ... & Siddiqi, I. N. (2014). p53 expression is a strong marker of inferior survival in de novo diffuse large B-cell lymphoma and may have enhanced negative effect with MYC coexpression: a single institutional clinicopathologic study. *American journal of clinical pathology*, 141(4), 593-604.
25. Wang, X. J., Medeiros, L. J., Bueso-Ramos, C. E., Tang, G., Wang, S., Oki, Y., ... & Reddy, N. (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(2), 194.

26. Xu-Monette, Z. Y., Tu, M., Jabbar, K. J., Cao, X., Tzankov, A., Visco, C., ... & Chiu, A. (2015). Clinical and biological significance of de novo CD5+ diffuse large B-cell lymphoma in Western countries. *Oncotarget*, *6*(8), 5615.
27. Pedersen, M. Ø., Gang, A. O., Poulsen, T. S., Knudsen, H., Lauritzen, A. F., Nielsen, S. L., ... & Nørgaard, P. (2012). Double-hit BCL 2/MYC translocations in a consecutive cohort of patients with large B-cell lymphoma—a single centre's experience. *European journal of haematology*, *89*(1), 63-71.
28. Barrans, S., Crouch, S., Smith, A., Turner, K., Owen, R., Patmore, R., ... & Jack, A. (2010). Rearrangement of MYC is associated with poor prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated in the era of rituximab. *Journal of clinical oncology*, *28*(20), 3360-3365.
29. Quesada, A. E., Medeiros, L. J., Desai, P. A., Lin, P., Westin, J. R., Hawsawi, H. M., ... & Yin, C. C. (2017). Increased MYC copy number is an independent prognostic factor in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Modern Pathology*, *30*(12), 1688.
30. Aukema, S. M., Kreuz, M., Kohler, C. W., Rosolowski, M., Hasenclever, D., Hummel, M., ... & Richter, J. (2014). Biological characterization of adult MYC-translocation-positive mature B-cell lymphomas other than molecular Burkitt lymphoma. *haematologica*, *99*(4), 726-735.
31. Li, S., Huang, W., Oki, Y., & Medeiros, L. J. (2017). MYC/BCL2/BCL6 triple hit lymphoma: A study of 33 patients who had an aggressive clinical course similar to patients with double hit lymphomas.
32. Scott, D. W., King, R. L., Staiger, A. M., Ben-Neriah, S., Jiang, A., Horn, H., ... & Schmitz, N. (2018). High grade B-cell lymphoma with MYC and BCL2 and/or BCL6 rearrangements with diffuse large B-cell lymphoma morphology. *Blood*, blood-2017.
33. Landsburg, D. J., Falkiewicz, M. K., Maly, J., Blum, K. A., Howlett, C., Feldman, T., ... & Torka, P. (2017). Outcomes of patients with double-hit lymphoma who achieve first complete remission.
34. Zeng, D., Desai, A., Yan, F., Gong, T., Ye, H., Ahmed, M., ... & Wang, M. (2018). Challenges and Opportunities for High-grade B-Cell Lymphoma With MYC and BCL2 and/or BCL6 Rearrangement (Double-hit Lymphoma). *American journal of clinical oncology*.
35. Petrich, A. M., Gandhi, M., Jovanovic, B., Castillo, J. J., Rajguru, S., Yang, D. T., ... & Lee, L. X. (2014). Impact of induction regimen and stem cell transplantation on outcomes in patients with double hit lymphoma: a large multicenter retrospective analysis. *Blood*, blood-2014.