



UNIVERSIDAD PERUANA DE CIENCIAS APLICADAS

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

PROGRAMA ACADÉMICO DE MEDICINA

Sobreexpresión de proteínas BCL2 y cMYC como factor pronóstico de la
sobrevida global en los pacientes adultos con linfoma difuso de células B
grandes en el INEN durante el periodo 2015-2017

TESIS

Para optar el título profesional de Médico Cirujano

AUTORES

Barrionuevo Ponte, Ana Cecilia (0000-0001-7425-0377)

Barrionuevo Ponte, Ana Sofía (0000-0002-9227-0125)

ASESOR

Segura Paucar, Eddy Roberto (0000-0003-3580-7712)

Barrionuevo Cornejo, Carlos Edmundo (0000-0003-2474-914X)

Lima, 14 de setiembre del 2022

DEDICATORIA

A nuestra familia, por apoyarnos siempre en nuestro camino

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a nuestra familia que nos ha brindado su apoyo incondicional y por inculcarnos el amor hacia nuestra vocación.

A los profesores de la carrera de medicina que nos enseñan día a día a ser mejores profesionales.

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: El linfoma difuso de células B grandes es el linfoma no Hodgkin más frecuente en todo el mundo. Se ha descrito que la sobreexpresión de las proteínas BCL2 y cMYC confieren a esta neoplasia una baja sobrevida global y mala respuesta al tratamiento. Nuestro objetivo fue evaluar la sobreexpresión de estas proteínas, con énfasis en la sobreexpresión de ambas como factor pronóstico de la sobrevida global a los 3 años.

MATERIALES Y METODO: Estudio de tipo cohorte retrospectivo con pacientes adultos del Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas con diagnóstico de linfoma difuso de células B grandes, en cuyas biopsias se realizó inmunohistoquímica para las proteínas BCL2 y cMYC durante el periodo 2015 – 2017. La sobrevida por grupos de sobreexpresión proteica fue evaluada mediante la prueba Log-Rank, el estimador de Kaplan-Meier y regresión de Cox.

RESULTADOS: En los 125 casos incluidos, la sobreexpresión de cMYC fue de 14,4% y de BCL2 fue de 45,6%. La sobreexpresión de ambos marcadores estuvo presente en un 22,40%. Uno de los mayores porcentajes de mortalidad acumulada (75,0%) estuvo en el grupo de sobreexpresión de ambas proteínas mientras que el grupo que no sobreexpresaba ninguna de ellas tuvo la menor mortalidad (63,6%). La comparación de sobrevida entre subgrupos de sobreexpresión proteica no fue significativa ($p=0,094$) en la prueba de Log-Rank. En el modelo de Cox ajustado, los estimadores puntuales de Hazard Ratios para la sobreexpresión proteica mostraron una duplicación del riesgo en comparación a los que no sobreexpresan ninguno, aunque estos no fueron significativos ($p>0,05$) y solo se han mostrado para efectos demostrativos.

CONCLUSIÓN: La sobreexpresión de cMYC y la sobreexpresión de BCL2 y cMYC no están asociadas a la sobrevida global a 3 años y no tendrían un rol predictivo pronóstico en esta población con su grado de avance de enfermedad. Futuros estudios con seguimientos más prolongados y muestras más amplias y mejor seleccionadas serán de utilidad para explorar mejor el rol pronóstico de estos marcadores en la población peruana.

Palabras claves: linfoma difuso de células B grandes; sobreexpresión; BCL2; cMYC; sobrevida global

ABSTRACT

INTRODUCTION: Diffuse large B-cell lymphoma is the most common non-Hodgkin's lymphoma worldwide. It has been described that the overexpression of the BCL2 and cMYC proteins gives this neoplasm a low overall survival and a poor response to treatment. Our objective was to evaluate the overexpression of these proteins, with emphasis on the overexpression of both as a prognostic factor for overall survival at 3 years.

MATERIALS AND METHOD: Retrospective cohort study with adult patients from the National Institute of Neoplastic Diseases diagnosed with diffuse large B-cell lymphoma, whose biopsies underwent immunohistochemistry for BCL2 and cMYC proteins during the 2015-2017 period. Protein overexpression groups were evaluated using the Log-Rank test, the Kaplan-Meier estimator and Cox regression.

RESULTS: In the 125 cases included, cMYC overexpression was 14.4% and BCL2 was 45.6%. The overexpression of both markers was present in 22.40%. One of the highest percentages of accumulated mortality (75.0%) was in the group with overexpression of both proteins, while the group that did not overexpress either of them had the lowest mortality (63.6%). The comparison of survival between protein overexpression subgroups was not significant ($p=0.094$) in the Log-Rank test. In the adjusted Cox model, the Hazard Ratios point estimators for protein overexpression showed a doubling of the risk compared to those that did not overexpress any, although these were not significant ($p>0.05$) and have only been shown for effects. demonstrative.

CONCLUSION: The overexpression of cMYC and the overexpression of BCL2 and cMYC are not associated with overall survival at 3 years and would not have a prognostic predictive role in this population with its degree of disease progression. Future studies with longer follow-ups and larger and better selected samples will be useful to better explore the prognostic role of these markers in the Peruvian population.

Keywords: diffuse large B-cell lymphoma; overexpression; BCL2; cMYC; overall survival

TABLA DE CONTENIDOS

1	INTRODUCCIÓN	1
2	OBJETIVOS E HIPOTESIS	4
2.1	Objetivo general:.....	4
2.2	Objetivos específicos:	4
2.3	Hipótesis	4
3	MATERIALES Y MÉTODOS	5
3.1	Diseño y contexto del estudio:.....	5
3.2	Población, elegibilidad y muestra:	5
3.3	Variables de estudio:.....	6
3.4	Fuentes de datos e instrumentos de recolección	7
3.5	Procedimientos de recolección de datos	8
3.6	Plan de análisis de datos	8
3.7	Aspectos éticos	9
4	RESULTADOS	10
4.1	Flujo y selección de los casos a estudiar.....	10
4.2	Características de la población	10
4.3	Características de la submuestra incluida	11
4.4	Sobreexpresión de ambas proteínas y otras covariables con la mortalidad y SG a los 3 años	11
4.5	Modelos de regresión de Cox	11
5	DISCUSIÓN.....	12
6	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	18

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Características sociodemográficas y no clínicas de la población de estudio.....	23
Tabla 1.2. Características clínicas de la población de estudio (n=125).....	24
Tabla 1.3. Características del tratamiento y otras variables (n=125)	24
Tabla 1.4. Características de los factores pronósticos (n=125)	25
Tabla 2. La sobreexpresión de las proteínas BCL2, cMYC y otras variables de acuerdo con la Sobrevida global y mortalidad a los 3 años. (n=125).....	26
Tabla 3. Modelos multivariantes de sobreexpresión de cMYC y BCL2 ajustado a diferentes variables. (n=125).....	27

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Flujograma de selección de la población de estudio.....	22
Figura 2. Comparación de la sobrevida global entre los que tienen y no tienen la IHQ para ambos marcadores	23
Figura 3. Sobrevida global del grupo de análisis (n=125).....	25
Figura 4. Curva de Kaplan-Meier de sobrevida global de acuerdo con la sobreexpresión de cMYC y BCL2	26

1 INTRODUCCIÓN

El linfoma no Hodgkin (LNH) es una enfermedad neoplásica clínicamente heterogénea, desde el punto de vista patológico, inmunofenotípico y genético. Incluye múltiples tipos de linfoma que comparten ciertas características, los cuales se clasifican clínicamente en linfomas indolentes o de crecimiento lento, linfomas agresivos y linfomas altamente agresivos(1). Según la Agencia Internacional para investigación en Cáncer (IARC) en el proyecto GLOBOCAN en el año 2012, el LNH se ubicó dentro de las 10 neoplasias más frecuentes en el mundo. En el Perú, según datos del Instituto Nacional de enfermedades neoplásicas (INEN) durante el periodo 2010-2012, se reportaron 2907 casos nuevos de LNH entre los limeños, representando el 4,8% de todas las neoplasias malignas, y fue la sexta causa de muerte por cáncer en Lima. Se registró 1.372 muertos por el LNH en ese periodo de tiempo, correspondiente a una tasa de mortalidad de 4,8 por 100.000 habitantes (2). Dentro de los linfomas agresivos se encuentran el linfoma difuso de células B grandes (LDCGB), que se caracteriza por un crecimiento rápido (1). Este linfoma, basado en características genéticas y origen celular, se clasifica en: células B de centro germinal (GCB) que se relaciona con un pronóstico favorable, células B activadas (ABC) con un pronóstico desfavorable, y un tercer subtipo para aquellos no clasificables. Los dos últimos se agrupan en los no-GCB (2). En un estudio realizado en Perú en el año 2016 en los hospitales Cayetano Heredia y Arzobispo Loayza, se indica que el LDCGB comprende el 40% de los LNH y 60% a 65% de los LNH de células B (3). Asimismo, el LDCGB representa aproximadamente el 30 a 40% de todas las neoplasias linfoide a nivel mundial (4).

Por otro lado, según un estudio realizado en Malasia durante el periodo de junio de 2012 y diciembre de 2015 en pacientes ≥ 15 años de diferentes etnias (malaya, india, china y otras) se indica que el pronóstico es desfavorable para los pacientes con LDCGB que presentan doble o triple translocación para los genes de BCL2, cMYC y BCL6 (doble o triple hit); y también para los que muestran sobreexpresión de las proteínas cMYC y BCL2 juntas (4). Esta sobreexpresión de proteínas en las células neoplásicas se determina mediante el método de inmunohistoquímica (IHQ). Si se sobreexpresan ambas al mismo tiempo se pueden usar los términos de coexpresión y doble expresión. (5). Cabe mencionar que cuando estas proteínas se expresan en niveles normales en las células no tienen un rol pronostico. Cada

un cumple con diferentes funciones; en el caso de la proteína BCL2, se sabe que es miembro de una familia reguladora de la apoptosis (familia BCL2), y favorece la sobrevivencia celular al ser una proteína antiapoptótica, pero si esta se sobreexpresa contribuye a la progresión de células neoplásicas y a la resistencia de quimioterápicos y a la radioterapia. Acerca de la función que cumple el proto-oncogén cMYC, se cree que induce proliferación al reclutar acetilasas de histonas que activan fenómenos de transcripción. En el cáncer se ha visto que favorece a la proliferación y se ha asociado a una alta tasa de crecimiento (6).

En cuanto a lo referido a la coexpresión de BCL2 y cMYC, un estudio realizado en el centro oncológico MD Anderson de la Universidad de Texas en el año 2013, en pacientes tratados con el tratamiento estándar R-CHOP (rituximab, ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisona), se encontró que la sobreexpresión de ambas proteínas se asoció con un pronóstico pobre (7). Otros estudios han encontrado entre el 29 a 64% de sobreexpresión de la proteína cMYC en pacientes con LDCGB y alrededor del 50% de la proteína BCL2. Mientras que se ha reportado entre el 19 y 24% con la sobreexpresión de ambas (4). A pesar de que este último grupo tenía menor porcentaje de prevalencia, demostraron que estos pacientes tenían una sobrevida global (SG) significativamente menor. Asimismo, encontraron que la coexpresión de la proteína cMYC/ BCL2 fue más común en las no-GCB y se consideró como pronóstico adverso (4). En un estudio realizado en Pakistán en el periodo de noviembre 2017 a diciembre 2020, se observó una mayor frecuencia de coexpresión (35,8%) y una asociación entre la coexpresión y el tipo no-GCB .

En un estudio en Bangkok, Tailandia en el periodo 2013 a 2014, se encontró que la coexpresión de cMYC y BCL2 se asoció con un peor pronóstico entre los pacientes que presentan el subtipo GCB, a diferencia de lo planteado por estudios anteriores en el que la coexpresión tiene peor pronóstico en el subtipo no-GCB (9). Por otro lado, en un estudio realizado en Quito, Ecuador en el periodo 2006 a 2015, se demostró que la mayor prevalencia de casos fue de subtipo GCB versus el no-GCB y que hubo sobreexpresión de cMYC mayoritariamente en los GCB (10). En un estudio en Chile entre los años 2015 y 2016 se estudió el impacto pronóstico tanto de la doble expresión como de la triple expresión (incluyendo BCL6) comparado con un grupo de ninguna expresión, en donde confirmaron un peor pronóstico en el primer grupo (11). A nivel nacional, un estudio de Lima, Perú entre los años 2005 y 2009 encontró que los casos GCB tuvieron mejor SG que los no-GCB y que los casos con cMYC y BCL2 negativos en IHQ tuvieron mejor SG y se encontraban en

mayor porcentaje en estadios tempranos, aunque no hallaron significancia estadística (12). Como se puede ver, la importancia de determinar la existencia de la sobreexpresión de ambas proteínas en este tipo de linfoma radica en su posible impacto como factor pronóstico de SG.

Se han encontrado pocos estudios peruanos en relación con la SG del LDCGB. Un estudio publicado en el año 2017 en el Hospital Edgardo Rebagliati demostró que la SG a los 5 años con el esquema RCHOP fue de 67% (13). Por otra parte, otros estudios en cuanto a este linfoma, en el país, han evaluado la SG de acuerdo a otros factores pronósticos adversos como el subtipo de linfoma e índice linfocito/monocito (12,14). Otros indicadores pronósticos estudiados para la SG han sido el IPI (índice pronostico internacional) y la albumina. En ese sentido, nuestro estudio aporta nueva data sobre SG en pacientes peruanos en relación con la sobreexpresión de los marcadores BCL2 y cMYC como factor pronostico.

Asimismo, hay pocos estudios en otros países de Latinoamérica sobre LDCGB y la sobreexpresión de las proteínas BCL2 y cMYC como factores pronósticos de SG. Siendo esta neoplasia la más frecuente de los LNH en nuestro país y teniendo una casuística de casos nuevos por año que va en crecimiento en el Perú, consideramos justificable esta evaluación para confirmar el valor pronóstico de estos marcadores. Se debe tener en cuenta, además, que la determinación de estas proteínas con el método de IHQ es accesible y de bajo costo en el Perú. Cabe anotar que, si bien es cierto, existen otros marcadores biológicos con posible valor pronóstico (por ejemplo, Ki67, PDL1, C30, EBV, etc.), los que han demostrado mejor correlación con la SG son BCL2 y cMYC. La determinación de factores pronósticos adversos es importante porque de esta manera se pueden seleccionar pacientes para tratamientos más efectivos.

2 OBJETIVOS E HIPOTESIS

2.1 Objetivo general:

Evaluar la sobreexpresión de las proteínas BCL2, cMYC, con énfasis en la sobreexpresión de ambas como factor pronóstico de la SG a 3 años en los pacientes adultos con LDCGB diagnosticados entre los años 2015 a 2017 en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (INEN).

2.2 Objetivos específicos:

- Describir las características generales y clínicas de los pacientes adultos diagnosticados con LDCGB entre los años 2015 a 2017 en el INEN.
- Evaluar la SG de la población estudiada, y diferenciada por inclusión en el estudio.
- Evaluar la frecuencia de sobreexpresión de BCL2 y cMYC en pacientes adultos diagnosticados con LDCGB entre los años 2015 a 2017 en el INEN.

2.3 Hipótesis

Los pacientes diagnosticados con LDCGB con sobreexpresión de ambas proteínas BCL2 y cMYC, tienen menor SG que los que no sobreexpresan ambas proteínas.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Diseño y contexto del estudio:

Este estudio fue de tipo observacional analítico en forma de una cohorte retrospectiva con un análisis de supervivencia para comparar grupos diferenciados por la sobreexpresión de las proteínas BCL2 y cMYC e identificar su asociación con la SG dentro de los tres años siguientes al diagnóstico. Es una cohorte porque existe un periodo de seguimiento y se establece la secuencia de sucesos de interés (relación temporal entre exposición y desenlace). El estudio de estos marcadores se comenzó a considerar aproximadamente desde el año 2013, sin embargo, no fue sino hasta el 2015 donde se estudiaron con mayor frecuencia. Es por eso que se escogió un rango de tiempo entre el 2015-2017, y se decidió hacer un seguimiento de SG a 3 años, debido a que este proyecto debía concluir en el año 2020. Es retrospectiva porque los casos ya fueron diagnosticados y los eventos ya sucedieron y fueron registrados en fuentes secundarias (historias clínicas). El estudio fue realizado en el INEN localizado en Lima, Perú.

3.2 Población, elegibilidad y muestra:

La población de interés fueron los pacientes adultos que ingresaron al INEN durante el periodo 2015 – 2017 con diagnóstico de LDCGB. Incluimos a pacientes adultos mayores de 18 años y en los que se realizó IHQ para ambas proteínas BCL2 y cMYC. Excluimos a pacientes sin historia clínica, a aquellos con datos incompletos, a los pacientes externos al INEN (aquellos que se atienden en otros hospitales, pero tienen diagnóstico en el INEN), a los que les faltaba alguna medición de las proteínas y los que tenían diagnóstico de VIH.

Para el cálculo de tamaño de muestra nos basamos en datos de un estudio referencial similar al nuestro (7). A partir de un Hazard Ratio de 2.5, con una probabilidad global del evento final de 50% (ambos datos tomados de la referencia 7), con una potencia del 80% y un nivel de confianza al 95%, estimamos que se necesitan al menos 75 sujetos y la ocurrencia de al menos 38 eventos para el estudio. Los cálculos fueron realizados usando el comando power cox en Stata.

Sin embargo, finalmente revisamos todas las historias clínicas disponibles en los años indicados las cuales fueron identificadas en forma no probabilística según fecha de ingreso y diagnóstico desde el 2015 hacia el 2017.

3.3 Variables de estudio:

La variable de exposición (independiente) fue la sobreexpresión de proteínas, la cual fue analizada como variable categórica politómica (sobreexpresa ambas, sobreexpresa solo cMYC, sobreexpresa solo BCL2 o no sobreexpresa ninguna) y el instrumento de medición para esta variable fue la IHQ.

Según la clasificación de la OMS la sobreexpresión de cMYC se da cuando, mediante el método de IHQ se encuentra $\geq 40\%$ de expresión nuclear en las células neoplásicas y en el caso de BCL2, $\geq 50\%$ de expresión citoplasmática en dichas células (5). A la sobreexpresión concomitante de ambas proteínas se le conoce también como “doble expresión” o “coexpresión (15). La OMS reconoce a la doble expresión de las proteínas cMYC y BCL2 como nuevo marcador pronóstico adverso(5).

La variable dependiente fue la SG que fue determinada como el tiempo transcurrido desde el diagnóstico hasta que la persona fallece dentro de los tres años de seguimiento o hasta que hayan concluido los tres años de seguimiento en ausencia de pérdidas.

Asimismo, se incluyeron las siguientes variables de control categóricas: Sexo (mujer, hombre), Subtipos de LDCGB(GCB, No-GCB), Estadios Clínicos (I,II,III,IV), Escala de calidad de vida de pacientes oncológicos ECOG (0; 1; 2; 3; 4), Índice Pronóstico Internacional para linfoma no Hodking (IPI) (Bajo, Intermedio bajo, Intermedio alto, Alto), Síntomas B que es la presencia de los siguientes síntomas: fiebre, sudoración y pérdida de peso (Si, No), Antecedentes Patológicos (Si, No), Intercurrencia (Si, No), Progresión de enfermedad (Si progreso, No progreso), Sobreexpresión de cMYC (Si, No) , Sobreexpresión de BCL2 (Si, No), Sitio primario (Ganglionar, Extraganglionar), Mortalidad acumulada a 3 años(Vivo, Muerto), Tratamiento (Completo, Incompleto), Respuesta al tratamiento (Completa , Parcial, No hay respuesta).

Se define tratamiento completo cuando se administraron 6 ciclos de RCHOP a los pacientes. Se define tratamiento incompleto cuando no se logra completar los 6 ciclos de RCHOP. La

variable respuesta al tratamiento se definió de acuerdo al “International Workshop to Standardize Response Criteria for Non-Hodgkin Lymphoma”. La Respuesta completa es definida como la desaparición de todas las lesiones y anormalidades radiológicas observadas al diagnóstico. La Respuesta parcial es definida como la regresión de toda lesión medible por más de 50%; también por la desaparición de lesiones no medibles y la ausencia de nuevas lesiones (4).

Y entre las variables de control cuantitativas se encuentran las siguientes: Edad (años), Índice linfocito-monocito (número absoluto de linfocitos/número absoluto de monocitos), Albumina (g/l), Células neoplásicas en sangre periférica, LDH (U/L), Número de sitios extraganglionares comprometidos, Fecha de diagnóstico, Fecha de ingreso y Fecha de la muerte.

3.4 Fuentes de datos e instrumentos de recolección

Utilizamos una ficha de registro que se diseñó con los datos obtenidos de las historias clínicas del INEN. El diagnóstico de LDCGB y el resultado de la IHQ se encuentran en los reportes de anatomía patológica en donde se informa el perfil inmunofenotípico (incluyendo si es GCB o no-GCB) y la sobreexpresión o no de BCL2 y cMYC. Cabe aclarar que el proceso por el cual el médico patólogo realiza el diagnóstico es a través de una evaluación histológica (tinción hematoxilina & eosina) de las biopsias obtenidas, para verificar si se trata de LNH, subtipo LDCGB, realizando IHQ para la determinación del perfil inmunofenotípico (CD20, CD3, CD10, BCL-6, MUM-1, etc.) y de BCL2 y cMYC con fines pronósticos. Como se mencionó antes, el punto de corte para sobreexpresión de BCL2 fue del 50% o más de células neoplásicas con tinción citoplasmática mediante IHQ y para a cMYC de 40% o más células neoplásicas con tinción nuclear (5). Para la determinación del subtipo GCB y no-GCB se utilizaron los marcadores CD10, BCL6 y MUM1, de acuerdo con el algoritmo de Hans (16).

En relación con la determinación de los puntos de corte y la sensibilidad y especificidad de la IHQ para estas proteínas, se han realizado varios estudios. En un reporte para determinar la utilidad de la IHQ en individuos con mayor riesgo de presencia de translocaciones compararon 2 puntos de cortes para BCL2. Los autores encontraron que cuando el punto de corte era de 50%, la IHQ tenía mayor sensibilidad (100%) y menor especificidad (39,7%) en

comparación con un punto de corte de 70% (88,9% y 67,2% respectivamente). Concluyeron que un punto de corte del 50%, ayudaría a seleccionar a los pacientes para realizar abordajes moleculares como el FISH (17). Sobre la proteína cMYC, un estudio que evaluó su especificidad y sensibilidad para predecir arreglos de cMYC, encontró que el punto de corte del 40 % mostró un aumento en la especificidad (40%) sin una pérdida significativa de sensibilidad (80%) en comparación con otros puntos de corte menores. Los puntos de cortes mayores como 95% son muy específicos, pero menos sensibles (18). En ambos estudios el método de referencia (gold estándar) que se utilizó para determinar los valores de sensibilidad y especificidad fue la prueba molecular FISH.

3.5 Procedimientos de recolección de datos

Este proyecto fue revisado por el comité de investigación de INEN. Uno de los investigadores fue un médico patólogo del INEN (requisito del instituto) quien facilitó la autorización y acceso a las historias clínicas mediante el sistema informático del INEN “SISINEN” el cual únicamente se encuentra accesible en la intranet de la institución. Para obtener los diagnósticos histológicos, del perfil inmunofenotípico y de las proteínas BCL2 y c-MYC, ingresamos a la sección “patología” del sistema SISINEN. Para obtener la información de SG, revisamos las fechas de ingreso, diagnóstico y fallecimiento. Las fechas de fallecimiento intrahospitalario fueron extraídas de las historias clínicas, mientras que las fechas de fallecimiento extrahospitalario fueron brindadas por personal del INEN, debido a que el instituto tiene un convenio con RENIEC por los estudios y vigilancia de cáncer que hacen.

3.6 Plan de análisis de datos

Describimos las variables categóricas mediante frecuencias absolutas y porcentajes y para las variables cuantitativas usamos la mediana y el rango intercuartílico. Para descartar un posible sesgo endógeno de selección, comparamos la sobrevida dentro de los tres años post diagnóstico entre los sujetos incluidos versus los excluidos. Utilizamos el método no paramétrico de Kaplan-Meier para estimar las curvas de sobrevida de toda la población de acuerdo con los niveles de la variable de exposición (sobreexpresión de proteínas). La comparación de estas curvas entre grupos (variables categóricas) fue mediante el Test de Log-Rank. Calculamos las medianas y rangos intercuartílico de los tiempos de SG entre

subgrupos de interés incluyendo a los subgrupos de la variable de exposición. Empleamos el análisis de regresión de riesgos proporcionales de Cox para estimar los Hazard ratios (HR) con sus respectivos intervalos de confianza al 95% considerando como evento *failure* la variable dicotómica mortalidad dentro de los tres años de seguimiento (19). En el análisis crudo consideramos a cada una de las demás variables por separado y en el análisis ajustado consideramos a la variable de exposición principal y también a aquellas que tuvieron un valor $p < 0,05$. Para obtener un modelo reducido utilizamos la técnica *backward selection* a partir del modelo ajustado y considerando un valor de $p < 0,05$ como criterio para extracción de variables. Las covariables de ajuste utilizadas en los modelos de Cox fueron seleccionadas en base a su significancia estadística durante el análisis crudo. Finalmente, para evaluar el supuesto de proporción de Cox hemos utilizado dos métodos: la introducción de variables que cambian con el tiempo y los residuos de Schoenfeld. Adicionalmente se exploraron otros factores que estuvieron asociados o no a la SG en estos pacientes, como albumina, el IPI y el tratamiento. Todos estos análisis se realizaron en el programa estadístico Stata 16 para Windows.

En la evaluación realizada con la prueba de Log-Rank para la variable de exposición y la sobrevida no encontramos alguna asociación, por lo que los resultados del modelo de Cox para esta variable han sido presentados solo para efectos académicos y demostrativos.

3.7 Aspectos éticos

Este trabajo fue revisado por el subcomité de ética de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas y por el comité de investigación del INEN. En el caso de nuestro estudio, al ser de cohorte retrospectivo, primero se pidió la aprobación del comité de investigación del INEN. Cabe resaltar que, en este tipo de estudios, el subcomité de ética del instituto indica que no se requiere consentimiento informado de los pacientes ya que no los afecta. Sin embargo, todos los pacientes que ingresan al INEN firman un consentimiento informado, indicando que se les puede realizar todos los estudios necesarios del material obtenido en un procedimiento quirúrgico. Por otro lado, los datos de los pacientes son confidenciales, ya que como se mencionó en la sección de procedimientos de recolección de datos, se garantiza que éstos son únicamente accesibles al personal autorizado del hospital y por lo tanto no son de acceso libre. Cabe recalcar que, durante este trabajo, no se utilizó los nombres de los pacientes, sino más bien se identificaron por sus

códigos de historia clínica y no se divulgó ningún otro dato personal de los pacientes. En otras palabras, el presente trabajo se mantuvo en absoluta confidencialidad los datos de identificación. Finalmente, la información obtenida fue utilizada únicamente para los propósitos expuesto en nuestros objetivos.

4 RESULTADOS

4.1 Flujo y selección de los casos a estudiar

Inicialmente identificamos 426 pacientes adultos con diagnóstico de linfoma de células B grandes (LDCGB) durante el periodo de 2015-2017 en el INEN. De ellos, 283 eran pacientes del INEN (los otros pacientes tuvieron el diagnóstico en la institución, pero se trataron en otros establecimientos) y se excluyeron 83 porque no cumplieron los criterios de inclusión, [51 por historias incompletas (no tenían todos los datos), 6 por historias repetidas, 4 por ser menores de edad, 19 por tener otro diagnóstico de linfoma, 3 por tener VIH] quedando 200 pacientes. De estos excluimos 75 por no contar con resultados para ambos marcadores BCL2 y c-MYC. El número final de casos incluidos en el estudio fue de 125 pacientes. Ver Figura 1.

4.2 Características de la población

Inicialmente describimos las características de los 200 casos identificados. En la población finalmente estudiada (n=125), la mayoría de los pacientes estuvo conformado por mujeres (51,20%), no tenían antecedentes patológicos (77,50%) y más de la mitad falleció dentro de los 3 años de seguimiento post diagnóstico (64,50%). Asimismo, la mediana de la edad fue de 61 años (RIC: 46-72), y la mediana de sobrevida global durante los 3 años de seguimiento fue de 309 días (RIC: 56-1095). Ver Tabla 1. Esta población incluida (n=125) fue comparada versus los que no tenían una o ninguna IHQ para los marcadores (n=75) y encontramos que no hubo diferencia significativa entre sus curvas de sobrevida (p=0.134 mediante prueba de Log-Rank). Ver figura 2 y 3.

4.3 Características de la submuestra incluida

En los 125 casos incluidos, detectamos que la sobreexpresión de solo cMYC fue de 14,4% y de solo BCL2 fue de 45,6%. La sobreexpresión de ambos marcadores estuvo presente en un 22,40%. Por otro lado, la mayoría de estos corresponden a un LDCGB tipo GCB con un 62,71%. En cuanto a laboratorio, las medianas y RICs fueron: de la hemoglobina fue de 11,55(RIC: 10,45-13,3), del índice linfocito-monocito fue 2,67(RIC: 1,64-5,90), de la albumina, 34,7(31,3-40,2), y la mayoría no presentaba HTLV1 positivo (97,04%). Considerando el tratamiento, la mayor parte lo recibió completo (48,39%) y de ellos el 92% recibió como tratamiento quimioterapia (RCHOP) y un 34% tuvo una respuesta completa. Asimismo, la mayor parte presentaban síntomas B (75,63%), sitio primario ganglionar (55,20%), se encontraban en estadio IV (32,80%) y ECOG 1(63,87%). Además, la media del número de sitios extra ganglionares fue de 1(0-1) y la de LDH fue 696(512-1210). La mayoría tenía un IPI intermedio alto (33,06%). Ver Tablas 1.2, 1.3 y 1.4

4.4 Sobreexpresión de ambas proteínas y otras covariables con la mortalidad y SG a los 3 años

Uno de los mayores porcentajes de mortalidad acumulada (75,0%) estuvo en el grupo de que sobreexpresan ambas proteínas mientras que el grupo que no sobreexpresaba ninguna de ellas tuvo la menor mortalidad (63,6%). Sin embargo, la comparación de curvas de supervivencia mediante la prueba de Log-Rank no fue significativa ($p=0,094$). Los valores de mediana y RIC de tiempo de supervivencia en días para el grupo de coexpresión fue de 88(29-808,5) mientras que para el grupo que no sobreexpresaba ninguna de ellas fue de 344(82-1095). La sobreexpresión solo de cMYC ($p=0,012$), el tratamiento ($p<0,001$), IPI($p<0,001$), síntomas B ($p=0,038$) fueron las únicas variables categóricas significativas en el análisis de Log-Rank. Ver Tabla 2 y figura 4

4.5 Modelos de regresión de Cox

Todas las variables categóricas y numéricas fueron incluidas en los modelos crudos al igual que la variable de exposición principal. Al construir el modelo ajustado, también hemos considerado confusores seleccionados (que fueron nuestras variables significativas durante el análisis crudo). Encontramos que los que sobreexpresan ambos marcadores no estuvieron asociados al desenlace con un HR de 2,19(IC=0,92-5,23) [$p=0,08$] en comparación a los que

no sobreexpresan ninguno. El tratamiento completo con un HR de 0.006(IC=0.026-0,14) [p de <0,001] en comparación con los que no recibieron tratamiento; el IPI alto HR de 3,02 (IC=1,32-6,93) [p=0,009] en comparación con un IPI bajo; presencia de síntomas B HR de 1,83(IC=0,96-3,51) [p=0,07] en comparación con los que no presentaban, la mayor cantidad de albumina como factor protector HR de 0,92(IC=0,88-0,96) [p=<0,001], y células neoplásicas en sangre HR de 1(IC=1,004-1,002) [p=0,004], continuaron siendo significativos. En el modelo ajustado reducido por el método de *backward selection*, hallamos que el tratamiento completo HR de 0,07(IC=0,034-0,16) [p=<0,001], el IPI alto HR 3,18(IC=1,51-6,71) [p=0,002], y la mayor cantidad de células neoplásicas en sangre se mantuvieron en el modelo, mientras que la variable de exposición original (sobreexpresion) fue excluida. Ver Tabla 3.

La evaluación del principio de proporcionalidad de los hazards requerido para la regresión de Cox fue realizado mediante los residuos de Schoenfeld. Encontramos que la variable de exposicion no cumplia dicho principio y por ello utilizamos el método de introducción de variables que cambian e interactúan con el tiempo dentro del modelo. Los HR para esta variable solo se presentan para efectos académicos y demostrativos. Luego de incorporar la variable con su interacción con el tiempo, y aplicar la reducción con el procedimiento de backward selection observamos que las células neoplásicas en sangre periférica (p=0,25) y el IPI alto (p=0,30) ya no eran significativas. Mientras que se mantienen significativos el tratamiento (p=<0,0001) y la albumina (p=0,04).

5 DISCUSIÓN

En este estudio, encontramos que los pacientes con LDCGB y que sobreexpresan ambas proteínas (BCL2 y cMYC) tuvieron casi el doble de riesgo de menor sobrevida en el tiempo en comparación con los que no sobreexpresan ningun marcador pero dicho resultado no fue estadísticamente significativo. Como hallazgo secundario encontramos que la sobreexpresión aislada de cMYC fue significativa para un mal pronóstico de SG. Otros factores pronósticos que impactan en la SG detectados en nuestro análisis fueron el IPI alto (como factor que incrementaba el hazard) y el tratamiento completo (como factor protector).

La frecuencia de la sobreexpresión de ambas proteínas es variable. En Asia, un estudio realizado en Rawalpindi, Pakistán entre los años 2018 y 2019 se encontró una frecuencia de 14% (20). Otros estudios como el de Malasia y otro estudio Pakistán tuvieron frecuencias de 49,3% y 35,8% respectivamente (4,8). Cifras similares a las de Tailandia con 46,6% (9). En África, Zagazig, Egipto durante los años 2011 a 2015 se encontró una frecuencia de 30% (5). En países occidentales como en un estudio de 2012 de Estados Unidos encontraron una frecuencia de 21% (21); en Canadá fue de 25% en 2017(22). En un estudio de Dinamarca del 2012, la frecuencia fue 29% (23). Asimismo en un estudio de Estados Unidos que incluía población de otros países (europeos como Italia, España, Suecia, países asiáticos como China, etc) encontraron una doble expresión de 34% (7). En nuestros casos, la frecuencia de la doble expresión fue de 22,40%, siendo menor que varios países asiáticos pero comparable a las cifras de los países occidentales. Por otro lado, las frecuencias de las sobreexpresiones únicas de BCL2 y cMYC en nuestro estudio, fueron 45,60% y 14,49% respectivamente, siendo similar a lo encontrado por Mohammed y colaboradores en relación con BCL2(46,7%) pero diferente a lo referido a cMYC (35,6%) (5). Estas diferencias pueden deberse al número de pacientes estudiados, metodología utilizada para la determinación de estos marcadores y quizá aspectos étnicos. Nuestra similitud con los países occidentales como Estados Unidos tal vez se debe a que hay mayor multiculturalidad y diversidad étnica en comparación con países asiáticos que suelen ser más homogéneos.

Es llamativo que la SG de todos nuestros pacientes fue baja (10 meses), con una mortalidad acumulada de 69,60% y que esta fue aún un poco más baja en los casos que sobreexpresaban ambas proteínas, con una mediana de SG de aproximadamente 3 meses, en relación con otros estudios que presentaban una mediana de SG de 14 meses y 10 meses (5,20). Es probable que múltiples factores influyan en este pobre pronóstico de SG en nuestros pacientes, por ejemplo, el hecho que la mayoría acude en estadios avanzados (32,80% en estadio IV) o que muchos abandonan el tratamiento (32,26%). Esto podría estar relacionado a factores socioeconómicos y educativos.

Un hallazgo interesante en nuestro estudio es que la SG fue más corta en los casos que sobreexpresaban ambas proteínas, aunque este dato no fue estadísticamente significativo ($p=0,09$). En un estudio de Tailandia tampoco encontraron significancia estadística, a pesar

de que la coexpresión de proteínas tenía peor SG (9). En nuestro estudio, es posible que esto se deba a que muchos casos fueron excluidos debido a que no tenían los estudios de cMYC y BCL2 completos, de tal modo que nuestra muestra de análisis no tuvo suficiente poder estadístico (125 casos). Como se muestra en nuestro análisis comparativo de sujetos incluidos versus excluidos, la disminución de la muestra aparentemente no introdujo un sesgo de selección, dejando abierta la posibilidad teórica de ser incluidos si hubiesen contado con las mediciones disponibles. En la literatura se ha descrito que la sobreexpresión de ambas proteínas se asocia a peor pronóstico en relación con SG como se reporta en un estudio de Nebraska, Estados Unidos cuyos pacientes formaron parte de una cohorte de estudios previos (24). La sinergia entre cMYC y BCL2 combina el efecto proliferativo del primero con la acción anti apoptótica del segundo, lo que confiere una ventaja para la continua proliferación y sobrevivencia de las células, esto es en parte la explicación de por qué la doble expresión es más agresiva (25).

Es de destacar que la sobreexpresión única de cMYC en nuestros pacientes sí tuvo un impacto negativo con significancia estadística en la SG ($p=0,012$), lo que también ha sido ya descrito previamente en otros reportes (5,25). El mecanismo que explica esto incluye la acción proliferativa que tiene el cMYC. Su sobreexpresión puede explicarse por translocación de $t(8; 14)(q24; q32)$, amplificación o disfunción de las vías que regulan la expresión de cMYC (15). En algunos estudios mencionan que la sobreexpresión de cMYC no es un predictor pronostico por sí solo, y que solo se encuentra cuando hay coexpresión de ambas proteínas (4,26).

No encontramos asociación entre los subtipos GCB y no-GCB de LDCGB determinados con IHQ, con la SG, aunque en otros tampoco se encontró correlación. En el estudio de Perry y colaboradores, se encontró que no hubo diferencias significativas en la SG en el grupo no-GCB. Asimismo, en el estudio de Dueñas y colaboradores, aunque los no-GCB tuvieron tendencia SG menor, los resultados no tuvieron significancia estadística (12,24). Si bien es cierto, dichos subgrupos moleculares tienen validez pronóstica ampliamente demostrada (27), los estudios de expresión con marcadores de IHQ para su determinación han sido controversiales. Esto puede explicarse por la subjetividad en el análisis de dichas expresiones para calcular el punto de corte considerado como positivo (30% de expresión) o incluso a la técnica utilizada. Actualmente, se han diseñado programas de análisis de imágenes que

intentan evitar la subjetividad, con software que determinan el porcentaje de expresión y la intensidad de marcadores de IHQ (28).

En cuanto a otros hallazgos, la mayoría de nuestros pacientes se encontraban en IPI intermedio alto (30,6%) y alto (27,27%). En el estudio de Mohammed y colaboradores, también se encontró mayor frecuencia en esos dos grupos con porcentajes similares de 36,7% y 22,2 % respectivamente (5). Asimismo, se encontró que había una asociación entre IPI alto y baja SG (2 meses aproximadamente) con una p significativa ($p < 0,001$), además el IPI alto tenía mayor hazard que un IPI bajo ($p < 0,002$), resultados que fueron similares a lo que se encontró en el estudio de Hu y colaboradores (7). Podemos confirmar que el IPI es uno de los mejores índices pronósticos en linfomas malignos. El IPI agrupa distintos factores pronósticos (edad, ECOG, estadio clínico, afectación extra ganglionar y LDH), que pueden predecir la evolución clínica de los LNH. Se califica un punto por cada característica, y se clasifica en grados de acuerdo con la puntuación. Un grado bajo es una puntuación de 0-1 (SG alta), mientras que un grado alto es de 4-5 (SG baja). Por otro lado, es comprensible que el hecho de haber recibido tratamiento es un efector protector.

Otro hallazgo que encontramos fue que la albumina es un buen marcador pronóstico en este tipo de linfomas, como también lo han demostrado otros estudios en donde demuestran que valores de albumina mayor igual a 3,7 tienen mejor SG (29).

La relevancia de este estudio es que es uno de los pocos que se han realizado en Perú y Latinoamérica en relación con el tema propuesto. Uno de los hallazgos más importantes de este estudio ha sido el describir el pronóstico de SG que tienen los pacientes estudiados, independientemente del estatus de doble expresión o no, probablemente por factores socioeconómicos o educativos, lo que debe implicar medidas correctivas en esos aspectos. Por otro lado, nuestro estudio confirmó la importancia de otros factores pronósticos conocidos para el LDCGB como es el IPI que implica la valoración del estadio clínico.

Al ser un estudio de cohorte retrospectivo, no pudimos controlar la exposición o el resultado de la evaluación, y tuvimos que depender de la información pasada para llevar un registro exacto. Asimismo, faltaban datos en la historia clínica de algunos pacientes. Esto redujo nuestra cantidad de casos incluidas en el análisis final. Adicionalmente, no descartamos la posibilidad de un posible sesgo de selección, debido a que es un estudio retrospectivo; y de información, ya que esta, la obtuvimos a través de historias clínicas. Para evitar los sesgos

se hizo una selección estricta de los casos, admitiendo solo aquellos que cumplan los criterios de inclusión que tengan toda la información requerida para los objetivos de este estudio. Por otra parte, la SG no se midió a partir del inicio de la enfermedad ni en una etapa temprana de esta, sino en estadios avanzados por lo que resultó en datos censurados. En cuanto a los antecedentes patológicos, puede considerarse como una limitación debido a que las enfermedades y sus características son muy variadas entre los pacientes. Por último, optamos por no usar otros métodos estadísticos más complejos para abordar escenarios donde no se cumple el principio de la proporcionalidad de los hazards, ya que decidimos darle más peso al análisis de log Rank y a la no diferencia significativa de mortalidad identificada y con ello nuestra variable de exposición original (sobreexpresión de proteínas) quedó descartada para todo proceso analítico posterior. Una explicación posible es que los pacientes llegan en un estadio avanzado de la enfermedad, momento en que las diferencias y capacidades pronósticas de los marcadores estudiados ya no serían muy evidentes. Tal vez, por el propio grado del avance de la enfermedad, empiecen otros fenómenos y procesos biológicos que son más determinantes para el desenlace de la enfermedad (como, por ejemplo, el compromiso clínico general o los tratamientos instaurados). Sin embargo, consideramos que esto no invalida los resultados y por el contrario brinda explicaciones alternativas y abre nuevas posibilidades y perspectivas de investigación a futuro sobre la necesidad y búsqueda de nuevos marcadores para esta población.

Una de las fortalezas de nuestra investigación es que no hay muchos estudios peruanos sobre la SG de este tipo de linfomas en relación con la sobreexpresión de los marcadores de BCL2 y cMYC como factor pronóstico. Otra fortaleza, es que el dato de SG a los 3 años es confiable debido a que la información de la fecha de muerte fue obtenida de la base de datos de la RENIEC. Por otro lado, en este estudio utilizamos métodos para evaluar el supuesto de proporcionalidad de Cox, lo cual no se suele realizar. Además, el procedimiento de IHQ con el que se identificó las expresiones de las proteínas es un método sencillo y accesible.

Recomendamos realizar un estudio semejante pero prospectivo para minimizar la ocurrencia de sesgos y con un mayor número de casos. De acuerdo con nuestros resultados, de los 200 pacientes que cumplían con los criterios de inclusión solo 125 contaban con el estudio de los dos marcadores, por lo que recomendamos que todo paciente diagnosticado con LDCGB tenga estudios de IHQ para cMYC y BCL2 para una mejor valoración clínica de su pronóstico de vida, dada su relación con baja SG. Cabe agregar que al realizar futuros

estudios con mayor muestra, mejor selección de sujetos, y un mayor seguimiento permitirá que se pueda seguir investigando capacidades predictivas. Por otro lado, teniendo en cuenta los estudios que validan la determinación de los grupos GCB y no-GCB por IHC, recomendamos la utilización de un software para el análisis de imágenes de estos estudios para evitar resultados poco objetivos. Finalmente, recomendamos realizar un estudio que tenga como objetivo las comparaciones entre diversas etnias.

En conclusión, en nuestro estudio hemos encontrado que la sobreexpresión de ambas proteínas (BCL2 y cMYC) no está asociada a la SG en esta población para el momento de progresión de enfermedad en el que han sido investigados. Cabe mencionar que como la sobreexpresión de ambas proteínas no está relacionada con la sobrevida y no es pronóstica ni predictiva del outcome en esta población estudiada, no es un predictor pronóstico. La no significancia estadística en nuestro estudio puede deberse a los pocos casos encontrados con criterios de inclusión y al grado avanzado de la enfermedad. La prevalencia de la coexpresión de cMYC y BCL2 en Perú es menor en comparación con países asiáticos, siendo más similar a países occidentales como Estados Unidos, probablemente por la diversidad étnica. A pesar de estas diferencias, todos los estudios revisados encontraron que la sobreexpresión concomitante de ambas proteínas tiene un impacto en la SG, independientemente del factor regional.

6 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Moreno J, Valderrama B, Moreno C. Enfermedades oncológicas. In Sevilla: Publicaciones Permanyer; 2007. p. 193–205.
2. MINSA, INEN. Registro de Cáncer de Lima Metropolitana, incidencia y mortalidad 2010-2012. 2016;5:107.
3. Castañeda-Ruiz P, Via y Rada F, Serra-Jaramillo R, Paz-Cornejo E, Salas-Sánchez F. Linfoma difuso de células B grandes: ¿una sola enfermedad? *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2017 Oct;34(3):551–9.
4. Teoh CS, Lee SY, Chiang SK, Chew TK, Goh AS. Impact of Double Expression of C-MYC/BCL2 Protein and Cell of Origin Subtypes on the Outcome among Patients with Diffuse Large B-Cell Lymphoma: a Single Asian Center Experience. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2018 May;19(5):1229–36.
5. Mohammed A, Rashed H, Abdelrahman A, Obaya A, Toam M, Abdel Nour H. C-MYC and BCL2: Correlation between Protein Over-Expression and Gene Translocation and Impact on Outcome in Diffuse Large B Cell Lymphoma. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2019;20(5):1463–70.
6. Castellanos Sinco H, Ramos C, Santoyo A, Collazo J. Linfomas no Hodgkin algunos tópicos sobre genética y patogénesis molecular. *Rev Venez Oncol*. 2016;28(2):121–34.
7. Hu S, Xu-Monette ZY, Tzankov A, Green T, Wu L, Balasubramanyam A, et al. MYC/BCL2 protein coexpression 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. *Blood*. 2013 May;121(20):4021–31.
8. Hashmi AA, Iftikhar SN, Nargus G, Ahmed O, Asghar IA, Shirazi UA, et al. Double-Expressor Phenotype (BCL-2/c-MYC Co-expression) of Diffuse Large B-

- Cell Lymphoma and Its Clinicopathological Correlation. *Cureus* [Internet]. 2021 Feb 5;13(2):e13155–e13155. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33692924>
9. Pinnark C, Surintrspanont J, Chaichana T, Wongphoom J, Chongpison Y, Shuangshoti S AT. Significance of MYC/BCL2 Double Expression in Diffuse Large B-cell Lymphomas: A Single-center Observational Preliminary Study of 88 Cases. *BKK Med J* [Internet]. 2018;14(1). Available from: <https://he02.tci-thaijo.org/index.php/bkkmedj/article/view/222198>
 10. Cevallos Espinel JA. “Clasificación inmunofenotípica en centro germinal y no centro germinal de linfomas difuso de células grandes b correlacionado con la sobreexpresión de la proteína c-myc. Hospital Metropolitano Quito 2006-2015. UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS; 2016.
 11. Peña C, Villegas P, Cabrera ME. Double or triple-expressor lymphomas: prognostic impact of immunohistochemistry in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Hematol Transfus cell Ther.* 2020;42(2):192–3.
 12. Dueñas D, Arboleda P, Casavilca S, Enríquez D, Mantilla R, Barrionuevo C. Linfoma difuso de células b grandes, NOS. Estudio clínico-patológico en una cohorte de pacientes peruanos. *Rev Peru Ciencias la Salud* [Internet]. 2020;2(3):137–45. Available from: <http://revistas.udh.edu.pe/index.php/RPCS/article/view/191>
 13. Beltrán B, De la Cruz-Vargas J. Características clínicas y sobrevida de los pacientes con linfoma de células grandes B difuso tratados con R-CHOP. *RevFacMedHum.* 2017;17(2):28–31.
 14. Beltran BE, Ramos W, De La Cruz-Vargas JA. Índice linfocito/monocito como factor pronóstico en linfoma células grandes B difuso en un hospital nacional de Lima-Perú, período 2010-2017. *Rev la Fac Med Humana.* 2019;19(2):40–7.
 15. Chen Y, Chen H, Chen L, Zheng X, Yang X, Zheng Z, et al. Immunohistochemical overexpression of BCL-2 protein predicts an inferior survival in patients with

- primary central nervous system diffuse large B-cell lymphoma. *Medicine (Baltimore)* [Internet]. 2019;98(45). Available from: https://journals.lww.com/md-journal/Fulltext/2019/11080/Immunohistochemical_overexpression_of_BCL_2.31.aspx
16. Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, Gascoyne RD, Delabie J, Ott G, et al. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood*. 2004 Jan;103(1):275–82.
 17. Oliveira CC, Domingues MAC, da Cunha IW, Soares FA. 50% versus 70%: is there a difference between these BCL2 cut-offs in immunohistochemistry for diffuse large B-cell lymphomas (DLBCL)? *Surg Exp Pathol* [Internet]. 2020;3(1):18. Available from: <https://doi.org/10.1186/s42047-020-00070-3>
 18. Hoeller S, Tzankov A, Stenner F, Dirnhofer S. When and how to test for C-MYC in aggressive B cell lymphomas. *J Hematop*. 2015 Mar 1;8(1):13–20.
 19. Molina Arias M. Hazard ratio: cuando el riesgo varía a lo largo del tiempo. *Pediatría Atención Primaria*. 2015;17:185–8.
 20. Naseem M, Asif M, Khadim MT, Ud-Din H, Jamal S, Shoaib I. The Frequency of Double Expresser in Selected Cases of High Grade Diffuse Large B-Cell Lymphomas. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2020 Apr;21(4):1103–7.
 21. Johnson NA, Slack GW, Savage KJ, Connors JM, Ben-Neriah S, Rogic S, et al. Concurrent expression of MYC and BCL2 in diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2012 Oct;30(28):3452–9.
 22. Petrella T, Copie-Bergman C, Brière J, Delarue R, Jardin F, Ruminy P, et al. BCL2 expression but not MYC and BCL2 coexpression predicts survival in elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma independently of cell of origin in the phase 3 LNH03-6B trial. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2017 May;28(5):1042–9.
 23. Green TM, Young KH, Visco C, Xu-Monette ZY, Orazi A, Go RS, et al.

Immunohistochemical Double-Hit Score Is a Strong Predictor of Outcome in Patients With Diffuse Large B-Cell Lymphoma Treated With Rituximab Plus Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine, and Prednisone. *J Clin Oncol* [Internet]. 2012 Jun 4;30(28):3460–7. Available from: <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.41.4342>

24. Perry AM, Alvarado-Bernal Y, Laurini JA, Smith LM, Slack GW TK et. a. MYC and BCL2 protein expression predicts survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab. *Br J Haematol*. 2014;165(3):382–91.
25. Nguyen L, Papenhausen P, Shao H. The Role of c-MYC in B-Cell Lymphomas: Diagnostic and Molecular Aspects. *Genes (Basel)*. 2017 Apr;8(4).
26. Ott G, Rosenwald A, Campo E. Understanding MYC-driven aggressive B-cell lymphomas: pathogenesis and classification. *Blood*. 2013 Dec;122(24):3884–91.
27. Cucco F, Barrans S, Sha C, Clipson A, Crouch S, Dobson R, et al. Distinct genetic changes reveal evolutionary history and heterogeneous molecular grade of DLBCL with MYC/BCL2 double-hit. *Leukemia*. 2020 May;34(5):1329–41.
28. Choi WWL, Weisenburger DD, Greiner TC, Piris MA, Banham AH, Delabie J, et al. A new immunostain algorithm classifies diffuse large B-cell lymphoma into molecular subtypes with high accuracy. *Clin cancer Res an Off J Am Assoc Cancer Res*. 2009 Sep;15(17):5494–502.
29. Dalia S, Chavez J, Little B, Bello C, Fisher K, Lee J-H, et al. Serum albumin retains independent prognostic significance in diffuse large B-cell lymphoma in the post-rituximab era. *Ann Hematol*. 2014 Aug;93(8):1305–12.

ANEXOS *Figura 1. Flujograma de selección de la población de estudio*

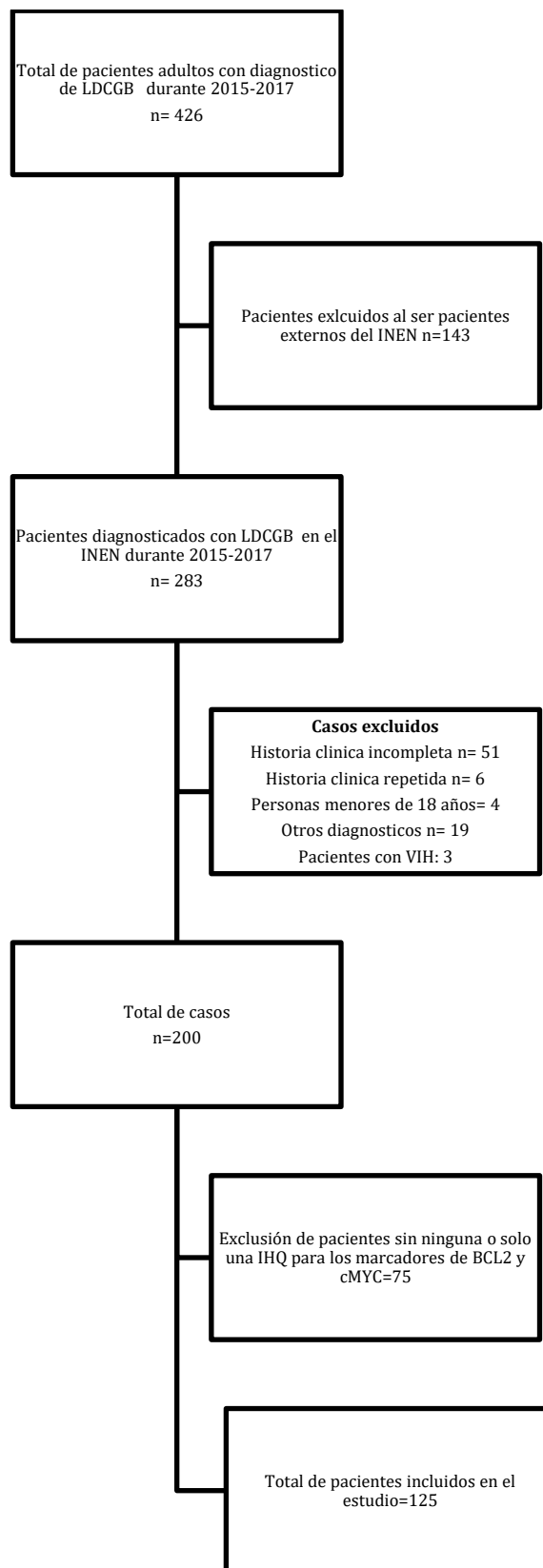


Tabla 1.1. Características sociodemográficas y no clínicas de la población de estudio.

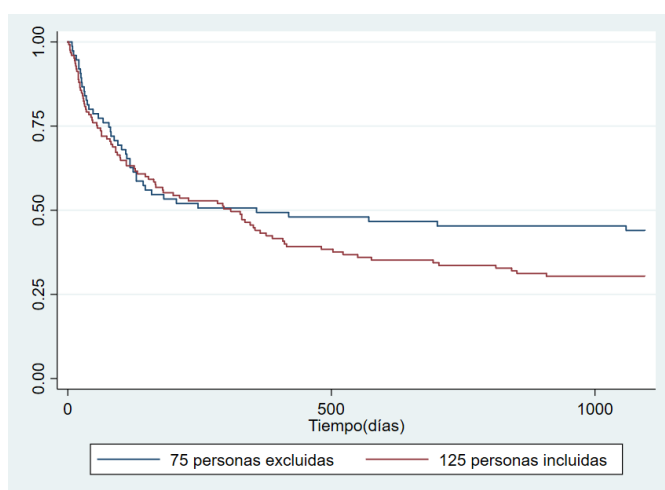
Variable	Total [n (%)]	Incluidos [*n=125]	Excluidos [**n=75]
Sexo			
Mujer	101 (50,5)	64(51,20)	37 (49,33)
Hombre	99 (49,5)	61(48,80)	38 (50,67)
Edad dx (Mediana y RIC)	61 (50-70)	61(46-72)	60 (54-69)
Antecedentes Patológicos			
Si	45 (22,50)	28(22,40)	17 (22,67)
No	155(77,50)	97(77,60)	58 (77,3)
Mortalidad acumulada a 3 años			
Vivo	71 (35,50)	38(30,40)	33(44,00)
Muerto	129 (64,50)	87(69,60)	42(56,00)
Sobrevida global a 3 años	318(63-1095)	309(56-1095)	358(78-1095)

n = 200 pacientes adultos diagnosticados con LDCGB en el INEN durante 2015-2017)

*n=125: pacientes que se les hizo la IHQ de ambos marcadores

**n=75: pacientes que tienen solo 1 o ningún marcador

Figura 2. Comparación de la supervivencia global entre los que tienen y no tienen la IHQ para ambos marcadores (n=125 vs n=75)



Rojo: 125 personas incluidas en el análisis. Azul: 75 personas excluidas del análisis

Log-Rank (p = 0.1337)

Tabla 1.2. Características clínicas de la población de estudio (n=125)

Variable	n (%)
Sobreexpresión de cMYC	
Si	46(36,80)
No	79(63,20)
Sobreexpresión de BCL2	
Si	85(68,00)
No	40(32,00)
Sobreexpresión de proteínas	
No sobreexpresa ninguno	22(17,6)
Sobreexpresa C-MYC	18(14,40)
Sobreexpresa BCL2	57(45,60)
Sobreexpresa ambos	28(22,40)
Subtipos de LDCGB	
GCB	74(62,71)
No-GCB	44(37,29)
Hemoglobina (Mediana y RIC)	11,55(10,45-13,3)
Índice linfocito-monocito (Mediana y RIC)	2,67(1,64-5,90)
Albumina (Mediana y RIC)	34,7(31,3-40,2)
Células neoplásicas en sangre periférica (Mediana y RIC)	0(0-0)
HTLV1 n (%)	
Si	2(2,06)
No	95(97,94)

NA= Número absoluto

HTLV1: Virus linfotrópico de células T humanas

Tabla 1.3. Características del tratamiento y otras variables (n=125)

Variable	n (%)
Tratamiento	
No recibido	24(19,35)
Completo	60(48,39)
Incompleto	40(32,26)
Tipo de tratamiento	
Quimioterapia	92(92,00)
Radioterapia	2(2,00)
Ambas	6(6,00)
Respuesta al tratamiento	
Completa	34(34,00)
Parcial	32(32,00)
No respuesta	24(24,00)
Síntomas B	
Si	90(75,63)
No	29(24,37)
Sitio primario	
Ganglionar	69(55,20)
Extra ganglionar	56(44,80)

Tabla 1.4. Características de los factores pronósticos (n=125)

Variable	n (%)
Estadio Clínico	
I	16(12,80)
II	38(30,40)
III	30(24,00)
IV	41(32,80)
ECOG	
0	-
1	76(63,87)
2	32(26,89)
3	11(9,24)
4	-
LDH (Mediana y RIC)	696(512-1210)
Número de sitios extra ganglionares (Mediana y RIC)	1(0-1)
IPI	
Bajo	24(19,83)
Intermedio bajo	24(19,83)
Intermedio alto	40(33,06)
Alto	33(27,27)

IPI: Índice Pronóstico Internacional para linfoma no Hodking. IPI es un índice que consiste en: ecog, edad, ldh, estadio clínico y #de sitios extra ganglionares

LDH: Lactato deshidrogenasa

ECOG: Escala de estado funcional ECOG (Grupo de Oncología Cooperativa del Este)

Figura 3. Sobrevida global del grupo de análisis (n=125)

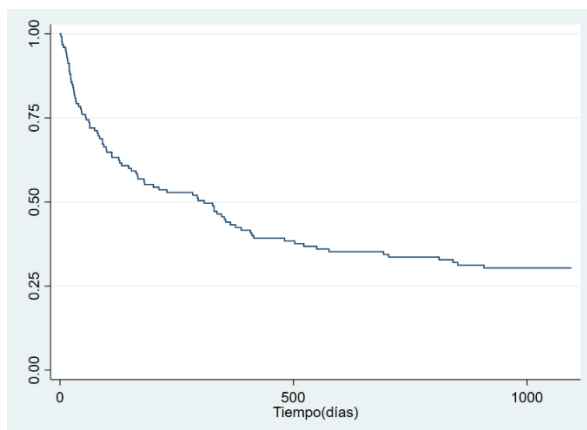


Tabla 2. La sobreexpresión de las proteínas BCL2, cMYC y otras variables de acuerdo con la Sobrevida global y mortalidad a los 3 años. (n=125)

Variable	Mortalidad acumulada a 3 años		*SG a 3 años p50(p25-p75)	**p
	n (%)			
	Viven	Mueren		
Sobreexpresión de proteínas				(p=0,094)
Sobreexpresa ambos	7(25,00)	21(75,00)	88(29-808,5)	
No sobreexpresa ninguno	8(36,36)	14(63,64)	344(82-1095)	
Sobreexpresa cMYC	4(22,22)	14(77,78)	95,5(23-550)	
Sobreexpresa BCL2	19(33,33)	38(66,67)	408(153-1095)	
Sobreexpresión de cMYC				(p=0,012)
Si	11(23,91)	35(76,09)	91(46-550)	
No	27(34,18)	52(65,82)	388(111-1095)	
Tratamiento				(p<0,001)
No recibido	2(8,33)	22(91,67)	27(12,5-132,5)	
Completo	34(56,67)	26(43,33)	1095(370,5-1095)	
Incompleto	2(5,00)	38(95,00)	105,5(51-253)	
Índice Pronóstico Internacional para linfoma no Hodgking (IPI)				(p<0,001)
Bajo	13(54,17)	11(45,83)	1095(312-1095)	
Intermedio bajo	12(50,00)	12(50,00)	973,5(302,5-1095)	
Intermedio alto	8(20,00)	32(80,00)	163,5(37-752,5)	
Alto	5(15,15)	28(84,85)	64(21-327)	
Síntomas B				(p=0,038)
Si	25(27,78)	65(72,22)	206(44-1095)	
No	13(44,83)	16(55,17)	704(181-1095)	

(**) p<0,05 con la prueba de Log-Rank/ (*) SG: sobrevida global

Figura 4. Curva de Kaplan-Meier de sobrevida global de acuerdo con la sobreexpresión de cMYC y BCL2

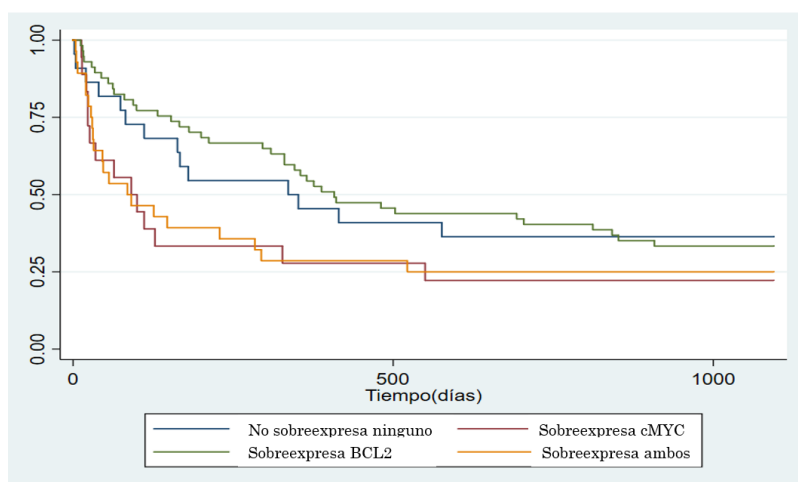


Tabla 3. Modelos multivariantes de sobreexpresión de cMYC y BCL2 ajustado a diferentes variables. (n=125)

	Modelo crudo			**Modelo ajustado inicial			***Modelo ajustado reducido		
	*HR	IC95%	p	*HR	IC95%	p	*HR	IC95%	p
Tratamiento									
No recibido	Ref.	Ref.		Ref.	Ref.		Ref.	Ref.	
Completo	0,13	0,07-0,23	<0,001	0,006	0,026-0,14	<0,001	0,07	0,034-0,16	<0,001
Incompleto	0,67	0,39-1,14	0,14	0,35	0,17-0,73	0,005	0,37	0,19-0,74	0,005
Índice Pronóstico Internacional para linfoma no Hodking (IPI)									
Bajo	Ref.	Ref.		Ref.	Ref.		Ref.	Ref.	
Intermedio bajo	1,11	0,48-2,5	0,81	1,22	0,47-3,18	0,67	1,15	0,47-2,80	0,75
Intermedio alto	2,63	1,32-5,23	0,006	1,30	0,59-2,86	0,50	1,19	0,56-2,51	0,64
Alto	3,72	1,84-7,52	<0,001	3,02	1,32-6,93	0,009	3,18	1,51-6,71	0,002
Células neoplásicas en sangre periférica									
Albumina	1,00	1,00021-1,00169	0,012	1,00	1,0004-1,002	0,004	1,00	1,0004-1,002	0,004
Sobreexpresión de proteínas	0,92	0,89-0,94	<0,001	0,92	0,88-0,96	<0,001	0,91	0,88-0,95	<0,001
Sobreexpresión de proteínas									
No sobreexpresa ninguno	Ref.	Ref.		Ref.	Ref.		Ref.	Ref.	
Sobreexpresa ambos	1,62	0,82-3,19	0,16	2,19	0,92-5,23	0,08	-	-	-
Sobreexpresa cMYC	1,71	0,81-3,61	0,15	2,20	0,91-5,31	0,08	-	-	-
Sobreexpresa BCL2	0,94	0,51-1,74	0,86	1,78	0,87-3,64	0,11	-	-	-
Síntomas B									
No	Ref.	Ref.		Ref.	Ref.		Ref.	Ref.	
Si	1,77	1,02-3,06	0,04	1,83	0,96-3,51	0,07	-	-	-
Hemoglobina	0,87	0,79-0,97	0,009	0,97	0,85-1,11	0,71	-	-	-
Índice linfocito/monocito	0,93	0,85-0,99	0,043	0,97	0,89-1,06	0,53	-	-	-
Sobreexpresión de cMYC									
No	Ref.	Ref.		Ref.	Ref.		Ref.	Ref.	
Si	1,73	1,12-2,65	0,01	-	-	-	-	-	-

*HR: Hazard ratio

**Ajustado por coexpresión de cMYC y BCL2, tratamiento, IPI, síntomas b, hemoglobina, índice linfocito/monocito, albumina y células neoplásicas.

*** Modelo ajustado reducido: realizado en variables con p significativas en modelo ajustado

Se agrego la variable exposición (sobreexpresión) solo para efectos académicos y demostrativos, a pesar de su significancia en el modelo bivariado y del principio de proporcionalidad de los hazards