



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado

Facultad de Medicina

Unidad de Posgrado

**Expresión de proteína de muerte programada 1,
su ligando y del RNA del virus de Epstein-Barr en
linfoma de Hodgkin relacionado al pronóstico de
vida en pacientes peruanos 2015-2018**

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Bioquímica

AUTOR

Maria del Rosario VILLA ROBLES

ASESOR

Dr. Carlos Edmundo BARRIONUEVO CORNEJO

Lima, Perú

2023



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Villa M. Expresión de proteína de muerte programada 1, su ligando y del RNA del virus de Epstein-Barr en linfoma de Hodgkin relacionado al pronóstico de vida en pacientes peruanos 2015-2018 [Tesis de maestría]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado; 2023.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	Maria del Rosario Villa Robles
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	06805123
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0001-8780-3700
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Carlos Edmundo Barrionuevo Cornejo
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	10305360
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0003-2474-914X
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	Doris Virginia Huerta Canales de Miranda
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	08213401
Miembro del jurado 1	
Nombres y apellidos	Nancy Joaquina Rojas Morán
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	08401186
Miembro del jurado 2	
Nombres y apellidos	Luz Dora Velásquez Ramos
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	07490576
Datos de investigación	
Línea de investigación	MEDICINA BÁSICA: PATOLOGÍA

Grupo de investigación	CAMPATIN
Agencia de financiamiento	Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. PCONFIGI A21011531
Ubicación geográfica de la investigación	Lima - Perú
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2021 - 2022
URL de disciplinas OCDE	Patología https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.01.09



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América



FACULTAD DE MEDICINA

Vicedecanato de Investigación y Posgrado
Sección Maestría

ACTA DE GRADO DE MAGÍSTER

En la ciudad de Lima, a los 17 días del mes de mayo del año dos mil veintitrés siendo las 09:00 hrs, bajo la presidencia de la Dra. Doris Virginia Huerta Canales de Miranda con la asistencia de los Profesores: Mg. Nancy Joaquina Rojas Morán (Miembro), Mg. Luz Dora Velasquez Ramos (Miembro), Dr. Carlos Edmundo Barrionuevo Cornejo (Asesor); la postulante al Grado de Magíster en Bioquímica, Bachiller en Ciencias Biológicas, procedió a hacer la exposición y defensa pública de su tesis titulada: **“EXPRESIÓN DE PROTEÍNA DE MUERTE PROGRAMADA 1, SU LIGANDO Y DEL RNA DEL VIRUS DE EPSTEIN-BARR EN LINFOMA DE HODGKIN RELACIONADO AL PRONÓSTICO DE VIDA EN PACIENTES PERUANOS 2015-2018”** con el fin de optar el Grado Académico de Magíster en Bioquímica. Concluida la exposición, se procedió a la evaluación correspondiente, habiendo obtenido la siguiente calificación **B MUY BUENO (17)**. A continuación, la Presidenta del Jurado recomienda a la Facultad de Medicina se le otorgue el Grado Académico de **MAGÍSTER EN BIOQUIMICA**, a la postulante **MARIA DEL ROSARIO VILLA ROBLES**.

Se extiende la presente Acta en dos originales y siendo las 10:40 hrs, se da por concluido el acto académico de sustentación.

Dra. Doris Virginia Huerta Canales de Miranda
Profesor Principal
Presidente

Mg. Nancy Joaquina Rojas Morán
Profesor Principal
Miembro

Mg. Luz Dora Velásquez Ramos
Profesor Asociado
Miembro



Dr. Carlos Edmundo Barrionuevo Cornejo
Profesor Principal
Asesor



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Vicerrectorado de Investigación y Posgrado



CERTIFICADO DE SIMILITUD

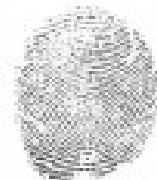
Yo, **Jorge Walter Calderón Morales** Jefe de la Sección de Maestría, responsable del software de similitud textual Turnitin, informar que se ha revisado y evaluado la tesis titulada: **“EXPRESIÓN DE PROTEÍNA DE MUERTE PROGRAMADA 1, SU LIGANDO Y DEL RNA DEL VIRUS DE EPSTEIN-BARR EN LINFOMA DE HODGKIN RELACIONADO AL PRONÓSTICO DE VIDA EN PACIENTES PERUANOS 2015-2018”** presentado por el/la maestrando(a) **María del Rosario Villa Robles** para optar el grado en **Magíster en Bioquímica**.

CERTIFICO que se ha cumplido con lo establecido en la Directiva de Originalidad y de Similitud de Trabajos Académicos, de Investigación y Producción Intelectual. Según la revisión, evaluación y análisis mediante el software para la detección de similitud textual, el documento evaluado cuenta con el porcentaje de **08%** de similitud, nivel **PERMITIDO**, para continuar con los trámites correspondientes y para su **publicación**.

Se emite el presente certificado con fines de continuar con los trámites respectivos para su publicación.

Firma del Jefe de Sección Maestría:

DNI: 07224844



Jorge Walter Calderón Morales

Nombres y apellidos del Jefe

DEDICATORIA

Dedico esta investigación a mis padres, quienes juntos me inculcaron día a día que el milagro de la vida es lo más valioso que Dios nos ha entregado; a mi padre que siempre confió en mis decisiones, a mi madre; porque sin ella no hubiese sido posible continuar y lograr mis objetivos, y a mis hijos, a quienes servirles de ejemplo es mi mayor satisfacción.

AGRADECIMIENTOS

Expreso mi agradecimiento a quienes de una u otra forma han contribuido en la realización de esta tesis, a toda la plana docente quienes han sido ejemplo de profesionalismo, dedicación y esmero para con los maestrandos y de manera especial a mi asesor, quien me acompañó y guio en el transcurso de esta investigación y que me demostró que no hay obstáculo alguno cuando nos proponemos cumplir nuestros objetivos.

ÍNDICE

Dedicatoria	i
Agradecimiento	ii
Índice	iii
Lista de tablas	v
Lista de figuras	vi
Glosario	vii
Resumen	x
Abstract	xi
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	1
1.1. Situación problemática	1
1.2. Formulación del problema	2
1.3. Justificación teórica	3
1.4. Justificación práctica	4
1.5. Objetivos	4
1.5.1. Objetivo general	4
1.5.2. Objetivos específicos	4
CAPÍTULO 2: MARCO TEÓRICO	6
2.1. Marco epistemológico de la investigación	6
2.2. Antecedentes de la investigación	7
2.3. Bases teóricas	9
CAPÍTULO 3: METODOLOGÍA	23

CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
4.1. Análisis, interpretación y discusión de resultados	30
4.2. Pruebas de hipótesis	40
4.3. Discusión	44
CONCLUSIONES	50
RECOMENDACIONES	51
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
ANEXOS	62

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Características de los pacientes en el estudio.

Tabla 2. PD-L1 y características de los pacientes en el estudio.

Tabla 3. PD-1 y características de los pacientes.

Tabla 4. Pacientes según PD-L1 y PD-1.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Imagen histológica de uno de los casos del estudio con LHC, en el que se muestra positividad de PD-L1 mediante IHQ en porcentaje mayor al 50% de las HRS.

Figura 2. Imagen histológica de uno de los casos del estudio con LHC, en el que se muestra positividad de PD-L1 mediante IHQ en porcentaje menor al 50% de las HRS.

Figura 3. Imagen histológica de uno de los casos del estudio con LHC, en el que se muestra positividad de PD-1 mediante IHQ en más de 15 linfocitos del MAT por CAP.

Figura 4. Imagen histológica de uno de los casos del estudio con LHC, en el que se muestra positividad de PD-1 mediante IHQ en menos de 15 linfocitos del MAT por CAP.

Figura 5. Imagen histológica de uno de los casos del estudio con LHC, en el que se muestra positividad para VEB mediante CISH EBER.

Figura 6. Curvas de la supervivencia global estimada según PD-L1.

Figura 7. Curvas de la supervivencia global estimada según PD-1.

GLOSARIO

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AP	Anatomía patológica
APC	Célula presentadora de antígeno
ARN	Ácido ribonucleico
BCL-2	Proteína inhibidora antiapoptótica de célula B de linfoma-2
BZLF1	Gen del VEB (fragmento BamHI Z)
CAR-T	Receptor quimérico de antígeno T
CD20	Designación de clona 20 (cluster designation)
CD279	Otra denominación de PD-1
CD30	Designación de clona 30 (cluster designation).
CG	Centro germinal del folículo linfoide
CISH	Hibridación in situ con cromógeno
CM	Celularidad mixta (variante de LHC)
CTL	Linfocito T citotóxico
CTLA-4	Proteína 4 asociada a linfocito T citotóxico
DL	Depleción linfocitaria (variante de LHC)
DLPT	Desorden linfoproliferativo de células T
EA	Eventos adversos
EBER	RNAs codificantes del VEB
EBNA	Genes del antígeno nuclear del VEB
EC	Estadio clínico
ELISA	Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima
EN	Esclerosis nodular (variante de LHC)
F	Femenino
GLR	Ganglios linfáticos reactivos
HC	Historia clínica
HDAC	Inhibidores de histona deacetilasa

HLA	Antígeno leucocitario humano
HRS	Célula de Reed Sternberg Hodgkin (célula neoplásica del LHC)
IFN	Interferón
IHQ	Inmunohistoquímica
IL	Interleucina
INEN	Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas
IRF-1	Factor nuclear regulador de interferón-1
JAK	Kinasa Janus
LBRCT	Linfoma de células B rico en células T
LCL	Línea de células linfoblastoides
LH	Linfoma de Hodgkin
LHC	Linfoma de Hodgkin Clásico
LHPLN	Linfoma de Hodgkin Predominantemente Linfocítico Nodular
LMP	Proteína latente de membrana del VEB
LP	Célula de predominio linfocítico (célula neoplásica del LHPLN)
LPS	Lipopolisacárido
M	Masculino
MAT	Microambiente tumoral
MCL-L1	Proteína inhibidora antiapoptótica codificada por el gen MCL-1
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
NE	No evaluable
NK	Célula asesina<< natural (natural killer)
PD-1	Proteína de muerte programada 1
PD-CD1	Otra denominación de PD-1
PD-L1	Ligando de la proteína de muerte programada 1
PV	Perdido de vista
QT	Quimioterapia
RL	Rico en linfocitos (variante de LHC)

SG	Supervivencia o sobrevida global
SLP	Supervivencia o sobrevida libre de progresión
STAT	Proteína de señal de traducción y activación de transcripción
Th	Linfocito T colaborador (helper)
TMA	Microfila de tejidos (tissue microarray)
TPH	Trasplante homólogo de médula ósea
Treg	Linfocito T regulador
VCE	Vivo con enfermedad
VEB	Virus Epstein-Barr
VEGF	Factor de crecimiento de endotelio vascular
VSE	Vivo sin enfermedad
ZEBRA	Factor de transcripción del VEB codificado por el gen BZLF1
Zta	Sinónimo de ZEBRA

EXPRESIÓN DE PROTEÍNA DE MUERTE PROGRAMADA 1, SU LIGANDO Y DEL RNA DEL VIRUS DE EPSTEIN-BARR EN LINFOMA DE HODGKIN RELACIONADO AL PRONÓSTICO DE VIDA EN PACIENTES PERUANOS 2015-2018

La determinación de la proteína de muerte programada 1 (PD-1) en los linfocitos presentes en el microambiente tumoral (MAT) y de su ligando (PD-L1) en las células neoplásicas han demostrado tener impacto en el pronóstico de diversas neoplasias. Asimismo, la presencia de un alto porcentaje de PD-L1 presente en células neoplásicas se ha asociado a una buena respuesta a la inmunoterapia con moléculas anti-PD-1 o anti PD-L1. Actualmente en el Perú, no hay estudios respecto a estas proteínas en relación con el linfoma de Hodgkin (LH). El objetivo de esta investigación fue determinar la expresión de PD-1 en linfocitos del MAT y de PD-L1 en las células neoplásicas Reed-Sternberg Hodgkin (HRS) del LH y su relación con la supervivencia global (SG) en pacientes atendidos en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas, durante los años 2015 - 2018. Asimismo, determinar la presencia del Virus Epstein-Barr (VEB) en las células HRS en relación con la expresión de PD-L1. Se estudiaron 79 muestras de pacientes con diagnóstico de LH, realizándose pruebas de inmunohistoquímica para la determinación de la expresión de PD-1 y PD-L1 y la prueba de hibridación in situ con cromógeno (EBER) para la determinación del VEB. La edad promedio fue de 33.3 años (rango 4-84 años) y predominó el sexo masculino (65.8%). Se observó que todos los casos del estudio mostraron expresión de PD-L1 en las células HRS. Un considerable porcentaje de células HRS tuvo elevados valores de PD-L1 (81%), en contraste, la mayoría de los linfocitos del MAT tuvieron bajos valores de PD-1 (75.9%). Respecto a los grupos de positividad para PD-L1 y PD-1, no hubo diferencia significativa en cuanto a la SG. Los pacientes EBER positivos, presentaron mayor expresión de PD-L1, mientras que, la menor expresión de PD-1 y la mayor positividad para EBER, estuvo asociada a pacientes de mayor edad. Los resultados obtenidos, representan un punto de partida para futuros ensayos clínicos en inmunoterapia de Linfoma de Hodgkin.

Palabras claves: Linfoma de Hodgkin, supervivencia global, PD-1, PD-L1, virus Epstein-Barr.

EXPRESSION OF PROGRAMMED DEATH PROTEIN 1, ITS LIGAND AND EPSTEIN-BARR VIRUS RNA IN HODGKIN'S LYMPHOMA RELATED TO SURVIVAL IN PERUVIAN PATIENTS 2015-2018

The determination of the programmed death protein 1 (PD-1) in lymphocytes present in the tumor microenvironment (MAT) and its ligand (PD-L1) in neoplastic cells have been shown to have an impact on the prognosis of various neoplasms. Likewise, the presence of a high percentage of PD-L1 present in neoplastic cells has been associated with a good response to immunotherapy with anti PD-1 or anti PD-L1 molecules. Currently in Peru, there are no studies regarding these proteins in relation to Hodgkin lymphoma (HL). The aim of this research was to determine the expression of PD-1 in MAT lymphocytes and PD-L1 in HL Reed-Sternberg Hodgkin (HRS) neoplastic cells and their relationship with overall survival (OS) in patients treated at the National Institute of Neoplastic Diseases, during the years 2015 - 2018. Likewise, to determine the presence of the Epstein-Barr Virus (EBV) in HRS cells in relation to the expression of PD-L1. 79 samples from patients diagnosed with HL were studied, performing immunohistochemical tests to determine the expression of PD-1 and PD-L1 and the chromogen in situ hybridization test (EBER) to determine EBV. The average age was 33.3 years (range 4-84 years) and the male sex predominated (65.8%). It was observed that all the cases in the study showed PD-L1 expression in the HRS cells. A considerable percentage of HRS cells had elevated PD-L1 values (81%), in contrast, most MAT lymphocytes had low PD-1 values (75.9%). Regarding the PD-L1 and PD-1 positivity groups, there was no significant difference in terms of OS. EBER-positive patients presented higher PD-L1 expression, while lower PD-1 expression and higher EBER positivity were associated with older patients. The results obtained represent a starting point for future clinical trials in immunotherapy for Hodgkin lymphoma.

Keywords: Hodgkin lymphoma, overall survival, PD-1, PD-L1, Epstein-Barr virus.

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

1.1 Situación problemática

El linfoma maligno es una neoplasia originada en los linfocitos y se clasifica en dos grandes grupos: el linfoma no Hodgkin (LNH), constituido por más de 60 diversas entidades y el linfoma de Hodgkin (LH). Este último se subdivide en dos tipos, el linfoma de Hodgkin clásico (LHC), frecuentemente asociado a la infección por el virus Epstein-Barr (VEB) y el tipo linfoma de Hodgkin predominantemente linfocítico nodular (LHPLN).

Cada uno de los subtipos presentan células neoplásicas específicas, así, por ejemplo, la célula de Reed Sternberg Hodgkin (HRS) se encuentra en el LHC, y la célula de tipo predominio linfocítico (PL) en el LHPLN (Stein, H; Pileri, S; Weiss, 2017).

En general, el LH tiene un mejor pronóstico que los LNH, por la eficacia que presenta la terapia convencional, aunque existe un subgrupo de casos con mal pronóstico y pobre respuesta al tratamiento (Rathore & Kadin, 2010) (Allen & Gordon, 2017).

Actualmente se sabe que uno de los mecanismos estratégicos utilizados por las células tumorales para evadir la vigilancia inmunológica, es la expresión del ligando de la proteína de muerte programada 1 (PD-L1), de tal forma que al unirse con la proteína de muerte programada 1 (PD-1), en los linfocitos T citotóxicos, se anula la acción citolítica de éstos. Una nueva herramienta para el tratamiento en cáncer es la inmunoterapia, en la que se estimula la respuesta de células T citotóxicas usualmente evitada por las células tumorales en diversos tipos de neoplasias (Kumar et al., 2021).

El mecanismo para contrarrestar el escape o evasión inmunitaria de las células neoplásicas se basa en el bloqueo de PD-1 mediante un anticuerpo anti-PD-1 lo que permite reactivar la función citolítica de los linfocitos T citotóxicos (Hui, 2019). También se ha demostrado que a mayor expresión de PD-L1 en células neoplásicas, la respuesta a la inmunoterapia es más eficaz (Lantuejoul et al., 2020) (Vargas-Rojas et al., 2008). Como en otras neoplasias malignas, en el LH se está investigando el uso de la inmunoterapia (Lin & Diefenbach, 2016) (Sun et al., 2020).

La importancia de realizar este estudio en nuestro país se basa en el hecho de que existen diferencias epidemiológicas en los LH de acuerdo con las diversas regiones del mundo. Se han descrito estas diferencias en países asiáticos, Estados Unidos y países de Europa occidental, de tal manera que podríamos encontrar ciertas peculiaridades en nuestra población (Nakatsuka & Aozasa, 2006).

Finalmente, se desconoce, si la sobreexpresión de PD-L1 o PD-1, tiene un impacto en el pronóstico, de la enfermedad de estos pacientes, (De Re et al., 2019).

1.2 Formulación del problema

1.2.1. Problema general

¿Cuál es la expresión de la proteína de muerte programada 1, su ligando y del RNA del virus de EPSTEIN-BARR en linfoma de HODGKIN, relacionado al pronóstico de vida en pacientes peruanos, ¿2015-2018?

1.2.2. Problemas específicos

1. ¿Cuál es la expresión de PD-L1 en células HRS mediante el método de IHQ y la relación de estos hallazgos con la SG en pacientes con LH ingresados al INEN en el periodo 2015-2018?

2. ¿Cuál es la expresión de PD-1 en linfocitos del MAT mediante IHQ y la relación de estos hallazgos con la SG en pacientes con LH ingresados al INEN en el periodo 2015-2018?
3. ¿Cuál es la expresión de PD-L1 en células HRS mediante el método de IHQ y la relación de estos hallazgos con la expresión del VEB en pacientes con LH ingresados al INEN en el periodo 2015-2018?
4. ¿Cuál es la expresión de PD-1 en linfocitos del MAT mediante IHQ y la relación de estos hallazgos con la expresión del VEB en pacientes con LH ingresados al INEN en el periodo 2015-2018?

1.3 Justificación teórica

El LH es una de las neoplasias linfoides más frecuente en nuestro país, con alta prevalencia en pacientes jóvenes y pediátricos; usualmente presenta buena respuesta a la terapia convencional, aunque no todos los pacientes responden favorablemente. Esto ha motivado la búsqueda de factores biológicos que pueden influir en el curso clínico de esta enfermedad.

La determinación de las proteínas PD-L1 en las células neoplásicas y de PD-1 en los linfocitos del microambiente tumoral (MAT) ha demostrado tener impacto pronóstico en otras neoplasias como por ejemplo en cáncer de pulmón, sobre todo, la asociación de porcentajes altos de PD-L1 en células neoplásicas con una buena respuesta a la inmunoterapia mediante una molécula anti-PD-1.

Se conoce también que la presencia del VEB ocurre en un 60 % de los casos de LH. Este hecho, permite plantear la investigación sobre la relación de la presencia del virus con la expresión de la proteína PD-1, lo que podría optimizar el diagnóstico y pronóstico mediante la expresión proteica del VEB y el consecuente uso de la inmunoterapia para estos pacientes.

En nuestro país, no se ha investigado la expresión tisular de estas proteínas en LH, de tal manera que su determinación podría servir como un biomarcador pronóstico de esta enfermedad. Por otro lado, los altos porcentajes de PD-L1

en las células neoplásicas en el LH, podría ser un biomarcador de respuesta a la inmunoterapia con anti-PD-1.

1.4. Justificación práctica

La determinación de la expresión de PD-L1 en las HRS podría usarse como un biomarcador de respuesta al tratamiento inmunológico con anti-PD-1. Por otro lado, el seguro integral de salud (SIS) viene cubriendo los elevados costos del tratamiento, así como las pruebas de laboratorio de inmunohistoquímica (IHQ) para la determinación de la expresión de estas proteínas en los tejidos tumorales. En consecuencia, los pacientes de bajos recursos económicos podrían beneficiarse con los resultados de esta investigación.

1.5 Objetivos

1.5.1 Objetivo general

Determinar la expresión de PD-L1 y la presencia del RNA del VEB en células neoplásicas HRS, de la proteína PD-1 en los linfocitos del MAT y buscar la relación de estos hallazgos con la SG en pacientes con LH ingresados al INEN en el periodo 2015 - 2018.

1.5.2 Objetivos específicos:

5. Determinar la expresión de PD-L1 en células HRS mediante el método de IHQ y buscar la relación de estos hallazgos con la SG en pacientes con LH ingresados al INEN en el periodo 2015-2018.
6. Determinar la expresión de PD-1 en linfocitos del MAT mediante IHQ y buscar la relación de estos hallazgos con la SG en pacientes con LH ingresados al INEN en el periodo 2015-2018.
7. Determinar la expresión de PD-L1 en células HRS mediante el método de IHQ y buscar la relación de estos hallazgos con la expresión del VEB en pacientes con LH ingresados al INEN en el periodo 2015-2018.

8. Determinar la expresión de PD-1 en linfocitos del MAT mediante IHQ y buscar la relación de estos hallazgos con la expresión del VEB en pacientes con LH ingresados al INEN en el periodo 2015-2018.

CAPÍTULO 2. MARCO TEÓRICO

2.1 Marco filosófico o epistemológico

Actualmente los avances en el conocimiento en torno a la inmunoterapia han alcanzado preponderancia en el campo del tratamiento oncológico (Waldman et al., 2020). Indagar sobre el comportamiento biológico de las células oncológicas, sus mecanismos de defensa, y las formas de cómo responden al entorno repercuten directamente en el pronóstico y sobrevida de los pacientes. La inmunoterapia está basada en el estímulo de los mecanismos inmunitarios propios que usualmente son bloqueados o inhibidos por las células tumorales (Kumar et al., 2021)

La utilización de técnicas de expresión proteica en tejidos y las técnicas moleculares como la hibridación in situ, puede brindar evidencias que permitan correlacionar la dinámica celular oncológica y el tratamiento (Waldman et al., 2020).

Las patologías oncológicas como los linfomas ocupan un lugar importante en el Perú y en el mundo (INEN, 2018; Sung et al., 2021), lo que conlleva a la necesidad de realizar investigaciones para entender mejor los procesos biológicos que intervienen en su génesis y progresión. Estas investigaciones también son útiles para clasificarlos de acuerdo con mecanismos fisiopatológicos con el fin de una mejor evaluación clínica y el diseño de terapias personalizadas (Stein, H; Pileri, S; Weiss, 2017). El avance tecnológico en métodos diagnósticos automatizados de laboratorio permite diagnósticos más eficaces y masivos. La utilización de estos debería implicar

estrategias de despistaje diagnóstico que debería ser asumido por los gobiernos en interacción con la industria farmacéutica para que sean accesibles a la población en general (Stahel et al., 2015).

2.2 Antecedentes de investigación

En un ensayo clínico fase 1 en una población de 23 pacientes de la clínica Mayo (Rochester, Minnesota, EE. UU.), evaluaron la actividad de nivolumab, un anticuerpo bloqueador de PD-1, para inhibir la evasión inmunitaria tumoral en pacientes con LH en recaída o refractario. La tasa de supervivencia libre de progresión a las 24 semanas fue del 86%. Los análisis de muestras tumorales previas al tratamiento de 10 pacientes revelaron ganancias en el número de copias en PD-L1 y PD-L2 y una mayor expresión de estos ligandos. Concluyeron, que Nivolumab tuvo una actividad terapéutica sustancial y un perfil de seguridad aceptable en pacientes con LH recidivante o refractario previamente tratado (Ansell et al., 2015).

Mediante un estudio descriptivo, realizaron hibridación in situ fluorescente para evaluar las alteraciones en PD-L1 y PD-L2 en 108 muestras de biopsias obtenidas de pacientes con LHC provenientes del Hospital de mujeres Brigham (Universidad de Stanford), Centro Médico de la Universidad VU y del Instituto del Cáncer Dana Farber, de EE. UU., que fueron tratados con el régimen Stanford V y tuvieron un seguimiento a largo plazo. El 97% de todos los LHC evaluados tenían alteraciones similares de los loci PD-L1 y PD-L2. Hubo una asociación entre la expresión de la proteína PD-L1 y la presencia de alteraciones genéticas. La supervivencia libre de progresión (SLP) estuvo disminuida significativamente en los pacientes con amplificación de la región 9p24.1 y su incidencia aumentó en pacientes con LHC y eventos adversos (EA). La amplificación de la región 9p24.1 es más común en pacientes con EA y se asoció con una SLP más corta en esta serie. En dicho estudio se sugiere más análisis sobre las alteraciones de la región 9p24.1 en pacientes tratados con regímenes estándar de inducción de LHC o bloqueo de puntos de control (Roemer et al., 2016).

Así también, mediante un estudio descriptivo correlacional, los autores midieron los niveles séricos de PD-1, PD-L1 y CTLA-4 mediante ELISA en 13 pacientes con LHC del Hospital de la Universidad de Sao Paulo. Demostraron asociación significativa de niveles elevados de PD-L1 con síntomas, estadificación avanzada, enfermedad voluminosa, alta velocidad de sedimentación globular y albúmina sérica baja. Los niveles de CTLA-4 estuvieron elevados en pacientes con mayor puntaje pronóstico internacional; sin embargo, la correlación con PD-1, PD-L1 y el índice pronóstico Internacional (IPI), no fue demostrada. De igual forma no hubo relación entre los puntos de control inmunológicos (PD-1 y PD-L1) y las proteínas circulantes con la respuesta al tratamiento y recaída; por el pequeño tamaño de la muestra, los autores no pudieron calcular la supervivencia general o libre de enfermedad (da Silva et al., 2018).

Evaluaron a 70 pacientes con LHC recidivante refractario (R/R) procedentes de 11 hospitales de China, que recibieron al menos una dosis de tislelizumab (anti-PD-1) se observa que después del seguimiento lograron una respuesta objetiva, con 44 (62,9%) de respuesta completa (RC). Las reacciones relacionadas con la perfusión ocurrieron en 27 pacientes (38,6%) experimentando un EA relacionado con el sistema inmunitario, el más común de los cuales fue la disfunción tiroidea. Once de los pacientes (15,7%) experimentaron al menos un EA debido al tratamiento, lo que provocó la interrupción o el retraso de la dosis. No se produjeron muertes debido a EA. El tratamiento de pacientes con LHC R/R, con tislelizumab fue generalmente bien tolerado y resultó en altas tasas de respuesta general y RC, traduciéndose en respuestas más duraderas (Song et al., 2020).

Así mismo, a fin de determinar la utilidad diagnóstica de PD-1 y PD-L1 en biopsias pequeñas de casos correspondientes a procesos reactivos en ganglios linfáticos (GLR), LHC y Linfoma B Rico en Células T (LBRCT). Se colectaron en total 59 biopsias embebidas en parafina: 25 biopsias de LHC, 3 biopsias de LBRT y 31 biopsias de GLR. Los resultados demostraron que la IHQ inicial para la expresión de PD-1 y PD-L1 puede ayudar al diagnóstico de LHC en biopsias pequeñas. Los casos de LHC mostraron una expresión general más baja de PD-1, 96% de los LHC tenían <5% de expresión de PD-

1 en las CRS frente a sólo un 10% de expresión dentro de la población linfocítica de los GLR ($P < 0,001$). Los casos de LBRCT siguieron una tendencia similar a la de LHC (Volaric et al., 2020).

Por otro lado, se planteó que, en un subconjunto de casos, principalmente del subtipo LHC, la infección con el Virus de Epstein-Barr (VEB), puede contribuir con la firma molecular distintiva de LHC, y a la expresión génica apropiada para este linaje. En estos casos, el VEB muestra una latencia de tipo II intermedia distintiva, caracterizada por la expresión de la proteína 1 de membrana latente (LMP1). La proteína LMP1 actúa como un imitador de la proteína CD40 coestimuladora, que activa y mantiene diferentes vías moleculares, incluida la supervivencia de las células B. En particular, el EBV se encuentra en las células RS en casi todos los casos de LHC en pacientes inmunodeprimidos con infección por VIH lo que hace presumir su relevancia en el sistema inmunitario (De Re et al., 2019).

2.3 Bases teóricas

2.3.1 Proteínas PD-1 y PD-L1

PD-1 también denominada PDCD1 o CD279, es una proteína receptor transmembrana tipo I que se expresa en la superficie de los linfocitos T, B, monocitos, células asesinas (NK) y células dendríticas, siendo sus ligandos PD-L1 y PD-L2. En el LHC, las alteraciones en el cromosoma 9 en el locus 9p24.1 incrementan la abundancia de estos ligandos y promueven su inducción mediante la señalización del transductor de señal y activador de la transcripción (STAT) de la quinasa Janus (JAK) (Ansell et al., 2015), (Lin & Dieffenbach, 2016).

Actualmente están descritas tres estructuras que muestran el dominio extracelular de PD-1 plegado en una estructura tipo sándwich de hebra beta, semejante al pliegue del motivo estructural denominado “llave griega”, el cual consiste en siete cadenas beta organizadas en dos hojas paralelas (Zak et al., 2017).

PD-1 y PD-L1 corresponden a “puntos de chequeo inmune”, cuya función es la modulación de la respuesta inmune ante una noxa, mediando el balance entre las señales inhibitorias y coestimuladoras, evitando de esta forma la auto tolerancia. Las células neoplásicas tienen la habilidad de expresar PD-L1 para evitar ser reconocidas por los linfocitos T, los cuales identifican a la proteína ligando mediante la PD-1 (Ventola, 2017).

PD-1 es producida principalmente por células T, B y mieloides activadas. En células T vírgenes, la expresión de PD-1 se induce tras la activación del receptor de células T (TCR). En ausencia de señalización del TCR, la expresión se pierde, contrariamente se mantiene con la estimulación crónica del antígeno, como ocurre durante la infección crónica viral o bacteriana y en la mayoría de los cánceres (Ventola, 2017).

Los ligandos PD-L1 (ligando 1 de PD-1, CD274 o B7-H1) y PD-L2 (ligando 2 de PD-1, CD273 o B7-DC) están presentes en la superficie de varios tipos de células. La interacción de PD-1 con PD-L1 o PD-L2 inhibe la activación de TCR, previniendo así la proliferación de células T, la producción de citoquinas y la adhesión. Muchas células tumorales regulan positivamente la PD-L1 en su superficie, inhibiendo así las células T que de otro modo podrían atacarlas (De Re et al., 2019).

Recientemente, se descubrió que PD-L1 interactúa con el receptor de células T coestimuladoras CD80, lo que resulta en la interrupción de la unión de PD-L1 / PD-1 en células dendríticas primarias maduras, en la restricción de la función de las células T positivas para PD-1 y en una exacerbación de la autoinmunidad. Estos hallazgos revelaron el potencial de CD80 para aumentar la activación de las células T no solo a través de la coestimulación de CD28, sino también al reducir la señal coinhibitoria impulsada por PD-1 (De Re et al., 2019).

Tanto la expresión de PD-L1 y PD-L2 se pueden inducir mediante la exposición a interferones (IFN). Sin embargo, mientras que PD-L1 está regulada principalmente por la señalización de IFN que converge en la unión del factor regulador de interferón nuclear 1 (IRF-1) al promotor; PD-L1, PD-L2

está regulada por IFN-beta e IFN-gamma a través de la unión de STAT3 e IRF-1 a su promotor (De Re et al., 2019).

PD-L2 se expresa en macrófagos inflamatorios por inducción de la citoquina alternativa Th2 IL-4, en cuanto PD-L1 se produce luego de la exposición a lipopolisacáridos (LPS) que genera principalmente una respuesta Th1. PD-1 tiene una mayor capacidad de unión para PD-L2. PD-L1, contrariamente a PD-L2, muestra una acción moduladora de la molécula coestimuladora CD80 con una propiedad intermedia entre la mostrada para CTLA-4 y CD28. La expresión de PD-L1 y PD-L2 se da ampliamente en leucocitos, células no linfoides y principalmente después de la exposición a citoquinas proinflamatorias e hipoxia, sin embargo, PD-L2 se expresa con mayor frecuencia en células dendríticas presentadoras de antígenos y monocitos. Generalmente la diferencia entre PD-L1 y PD-L2 debería reflejarse en diferentes efectos biológicos y funciones en la regulación de las respuestas Th1 y Th2 (De Re et al., 2019).

Por la tanto la comparación de las funciones de PD-L1 y PD-L2 todavía está bajo investigación y a la fecha, pocos estudios han examinado las correlaciones de diferentes tipos de infiltrados de células inmunes con la importancia pronóstica y terapéutica de PD-L2 en cánceres humanos.

2.3.2 Linfoma de Hodgkin

El LH es una neoplasia maligna que presenta linfocitos anormales caracterizada por afectar los ganglios linfáticos y cursa de forma progresiva e indolente. Se clasifica en los tipos LHC y el LHPLN. El LHC es un tipo de LH cuyas células neoplásicas son las HRS, que se asocia a la infección por el VEB, en un porcentaje de casos. Las HRS están rodeadas por linfocitos T y otras células inflamatorias. El LHPLN es el otro tipo de LH cuya célula neoplásica es la PL, la misma que está rodeada por linfocitos B y linfocitos T, y que no está asociada a la infección por el VEB (Stein, H; Pileri, S; Weiss, 2017).

En el Perú, el LH corresponde aproximadamente al 9 % de todos los linfomas malignos (INEN, 2018), y a nivel internacional el tipo LHC es el más frecuente y constituye alrededor del 90% de todos los casos de LH (Wang et al., 2019).

El pronóstico de LH es favorable en ambos subtipos, con curación en más del 85% de casos de LHC con la poliquimioterapia moderna (Stein, H; Pileri, S; Weiss, 2017). Sin embargo, existe un subgrupo de casos que no responden al tratamiento convencional o recaen luego de éste, por lo que se requiere de nuevas estrategias terapéuticas. Recientemente la administración de alimentos y drogas de Estados Unidos ha aprobado el uso de la inmunoterapia para estos casos, mediante la administración de medicamentos que inhiben la proteína de punto de chequeo PD-1 (Lin & Diefenbach, 2016), (De Re et al., 2019).

En el diagnóstico diferencial entre LHPLN y LHC, la IHQ basada en marcadores de células B y T (CD15 y CD30) es de ayuda limitada, ya que no existen marcadores específicos de LH. Las células HRS son el sello distintivo de LHC. Son células gigantes bi o polinucleadas con nucléolos prominentes. El origen de estas células ha sido tema de varios debates durante mucho tiempo ya que pierden la expresión de marcadores específicos de linaje (CD20-negativos, CD30-positivos y algunas veces CD15). Un estudio de secuenciación reciente clasificó a las células HRS como derivadas de células B de centrocitos proapoptóticos del centro germinal que redirigían a centroblastos, pero, a diferencia de su contraparte fisiológica, este evento no es transitorio (Stein, H; Pileri, S; Weiss, 2017).

2.3.3 Inmunología tumoral

El principal mecanismo inmunológico de la erradicación de tumores es la destrucción de las células tumorales mediante los linfocitos T citotóxicos (CTL) específicos para antígenos tumorales. Esto se debe a que la mayoría de los tumores tienen neoantígenos, productos génicos mutados o proteínas virales que se sintetizan y presentan de forma endógena en el contexto de las moléculas MHC de clase I, lo que permite su reconocimiento por CTL. Aunque los sueros de pacientes con cáncer pueden contener anticuerpos que reconocen tumores, hay poca evidencia de que tengan alguna función protectora bajo condiciones fisiológicas. Las respuestas de CTL contra tumores se inician por reconocimiento de antígenos tumorales en células presentadoras de antígenos del huésped (APC) (Kumar et al., 2021).

Muchos cánceres, en particular los que se encuentran en proliferación, tienen una alta fracción de células que son sometidas a muerte celular, ya sea por mecanismos de apoptosis o necrosis. Las células dendríticas y macrófagos del microambiente tumoral fagocitan células o antígenos tumorales liberados y migran hacia los ganglios linfáticos donde presentan los antígenos con participación de las moléculas de MHC de clase II y, a través de un mecanismo llamado presentación cruzada, también en el contexto de MHC, a moléculas de clase I, lo que permite que los antígenos sean reconocidos por CTL CD8+ (Galon & Bruni, 2020).

Además, los CTL requieren moléculas coestimuladoras, que están reguladas al alza en las APC. Una vez activados por interacción con las APC, los CTL específicos del tumor, pueden migrar de los ganglios linfáticos hacia éste y lisar las células tumorales directamente. La intensa actividad antitumoral de los CTL para lisar células tumorales independientemente de otros tipos de células y factores se debe a su capacidad de expresar receptores de antígenos quiméricos (las llamadas células CAR-T), contra antígenos de superficie de linaje específico en ciertos tumores. Por ejemplo, las células CAR-T específicas para antígenos de células B son muy activas contra los tumores de células B, pero también aniquilan las células B normales y liberan suficientes citocinas inflamatorias para causar morbilidad y en ocasiones la muerte del paciente (Kumar et al., 2021).

Aunque los CTL parecen tener un papel fundamental en la inmunidad tumoral, otros mecanismos también pueden participar. Se han detectado respuestas antitumorales de células T CD4+ en ciertos pacientes, específicamente un mayor número de células T efectoras CD4+; especialmente las células Th1 en infiltrados tumorales, lo que se ha asociado con mejor pronóstico en ciertos cánceres, como el carcinoma colorrectal. En sistemas experimentales, las células asesinas naturales (NK) y los macrófagos activados son capaces de lisar células tumorales. Después de la activación con interleucina 2 (IL-2) y IL-15, las células NK están en la capacidad de lisar una amplia gama de tumores, incluidos aquellos que no son inmunogénicos para las células T debido a la pérdida de expresión de moléculas de MHC de clase I. Las células NK no requieren sensibilización

previa para destruir las células tumorales, lo que sugiere que podrían constituir una primera línea de defensa. Cabe resaltar que a pesar de la importancia de las células NK en las respuestas del huésped contra los tumores espontáneos aún no está bien establecida, las citocinas que activan las células NK se utilizan para inmunoterapia. Los macrófagos activados también exhiben citotoxicidad contra células tumorales in vitro. Un potente activador de macrófagos es el Interferón-gamma, citoquina secretada por células T y células NK que permite que éstas eliminen células tumorales mediante mecanismos similares a los que se usan para eliminar microorganismos (Galon & Bruni, 2020).

2.3.4 Mecanismo de evasión inmune por células cancerígenas

Las respuestas inmunitarias a menudo no controlan el crecimiento del tumor porque las células neoplásicas malignas evaden el reconocimiento inmunológico. Existen varios mecanismos de evasión propuestos:

- **Crecimiento selectivo de variantes antígeno negativas.** Según se da la progresión tumoral, se produce la eliminación de antígenos fuertemente inmunogénicos expresados por los subclones y las células tumorales y prevalecen las que han perdido sus antígenos. Si las células tumorales expresan una gran cantidad de neoantígenos, es poco probable la eliminación de la totalidad de estos, de tal manera que este mecanismo es insuficiente (Kumar et al., 2021).
- **Reducción o pérdida de la expresión de moléculas MHC.** Durante la progresión de la enfermedad las células tumorales expresan anormalmente niveles de moléculas de HLA de clase I, perdiendo así la capacidad de mostrar antígenos citosólicos huyendo así del ataque de las células T citotóxicas. Sin embargo, las células tumorales pueden desencadenar la presencia de células NK si expresan ligandos para receptores activadores de estas (Kumar et al., 2021).
- **Compromiso de las vías que inhiben la activación de las células T.** Las células inhiben la inmunidad tumoral regulando el incremento de los "puntos de control" regulatorios que inhiben la respuesta inmunológica. A través de una variedad de mecanismos, las células

tumorales pueden promover la expresión del receptor inhibidor CTLA-4 en células T específicas del tumor. CTLA-4 se une y bloquea sus ligandos, las moléculas B7, de las APC, reduciendo la acción del receptor coestimulador activador CD28. Las células tumorales pueden regular la expresión de proteínas de superficie celular PD-L1 y PD-L2, que activan PD-1 en las células T efectoras. De tal modo que PD-1, como CTLA-4, inhibe las células T activación. En algunos casos, la sobreexpresión de PD-L1 y PD-L2 es causada por amplificación o translocación de los genes PD-L1 y PD-L2. Basado en resultados prometedores en ensayos clínicos, se ha diseñado anticuerpos que restauran la función de las células T bloqueando los receptores CTLA-4 y PD-L o inhibiendo directamente PD-1. Estos anticuerpos ahora están aprobados para el tratamiento de pacientes en ciertos estadios de tumores sólidos y algunas formas de linfoma. El éxito de estos agentes ha llevado a un nuevo paradigma en inmunoterapia contra el cáncer, llamada "bloqueo del punto de control", que se fundamenta en la eliminación de los "frenos" (puntos de control) impuestos por los tumores en las respuestas inmunitarias antitumorales del huésped. (De Re et al., 2019).

- **Secreción de factores inmunosupresores.** Las células neoplásicas malignas pueden secretar diversos productos que inhiben la respuesta inmune del huésped. El TGF- β es secretado en niveles altos por muchos tumores y es un potente inmunosupresor. Es probable que muchos otros factores solubles inhiban la respuesta inmune del huésped, incluyendo IL-10, prostaglandina E2, ciertos metabolitos derivados del triptófano y VEGF. Este último puede inhibir el movimiento de las células T desde la vasculatura al lecho tumoral (Spranger & Gajewski, 2018).
- **Inducción de células T reguladoras (Tregs).** Algunos estudios sugieren que los tumores producen factores que favorecen el desarrollo de Treg inmunosupresoras. En el LHC se ha observado que la sobreexpresión de PD-L1 en las HRS y de PD-1 en los linfocitos T que infiltran el área tumoral crea una potente inhibición de señales que ayudan a mantener un microambiente inmunosupresor, permitiendo la evasión de la vigilancia

inmunológica por parte de las HRS. Se ha asociado la sobreexpresión de PD-L1 y PD-1 con un mal pronóstico en LH. El uso de terapia con inhibidores de PD-1 en LH continua en investigación para búsqueda de mayores beneficios en el tratamiento de esta neoplasia (De Re et al., 2019; Lin & Diefenbach, 2016).

2.3.5. Virus Epstein-Barr

El VEB es un virus herpes gamma humano que fue identificado por primera vez en Londres en 1964 por un equipo de investigación dirigido por M. Anthony Epstein mediante microscopía electrónica de cultivos celulares derivados de biopsias de tumores de niños ugandeses con linfoma de Burkitt, proporcionando la primera evidencia de un virus asociado a tumores en humanos (Epstein et al., 1964).

Los estudios de la cepa B95-8 del VEB (aislada de una línea celular secundaria de primates obtenida al infectar linfocitos de tití con VEB), revelaron que los viriones EBV tienen un genoma de ADN lineal de doble hebra de aproximadamente 172 kb de longitud y que codifican 80-85 genes. La secuenciación también ha mostrado que el VEB se puede clasificar en dos cepas principales, tipo 1 (VEB-1) y tipo 2 (VEB-2), por diferencias genéticas en los genes del antígeno nuclear de Epstein-Barr (EBNA), siendo la cepa B95-8 de tipo 1 (Rickinson, 2007).

Después de la entrada en las células B, el ADN viral lineal es "circulizado" por la ligazón de las repeticiones terminales víricas, un proceso que combina los segmentos codificantes desarticulados del gen LMP-2A codificado por el VEB, en una unidad transcripcionalmente funcional, creando una secuencia de ADN corta y única que se puede utilizar para evaluar la "clonalidad" del virus en células infectadas por el VEB. Luego, el genoma viral se organiza en nucleosomas y se empaqueta en una estructura compleja de mini cromosomas llamado episoma, mediante el reclutamiento de proteínas celulares, como histonas y complejos de remodelación de cromatina.

Posteriormente, éste puede modificarse por acetilación o metilación por la maquinaria epigenética de la célula. Las modificaciones epigenéticas del episoma del VEB son esenciales para regular el cambio del ciclo lítico al latente y viceversa (Raab-Traub & Flynn, 1986).

La arquitectura similar a la cromatina y la metilación del ADN del genoma del VEB en células infectadas de forma latente, explican por qué los inhibidores de la histona deacetilasa (HDAC) y los agentes desmetilantes son potentes inductores de la activación del ciclo lítico del VEB *in vitro* e *in vivo*, en particular a través de sus efectos en las marcas epigenéticas represivas de la región promotora (Zta) del gen temprano inmediato BZLF1 del VEB (también conocido como ZEBRA) en células infectadas de forma latente. Estas observaciones implican un potencial riesgo de inducir la reactivación del VEB y por tanto de neoplasias malignas secundarias asociadas al VEB en pacientes a los que se administran estos fármacos inhibidores de HDAC (vorinostat, romidepsina y belinostat). Al mismo tiempo, estas observaciones señalan el camino hacia nuevas estrategias para sensibilizar a las células tumorales infectadas por el VEB al efecto citotóxico del ganciclovir y otros fármacos antivirales (Gru et al., 2015).

Según los modelos de infección primaria, que postulan una interacción dinámica entre el virus y el compartimento de células B en el huésped inmunocompetente, el VEB se replica inicialmente en el epitelio o en las células B de la orofaringe y luego, bajo la presión selectiva de un organismo eficaz, la respuesta inmune celular apaga la mayoría de sus genes y entra en un estado de latencia, siendo las células B de memoria en reposo el reservorio principal (Gru et al., 2015).

La LMP-1 es una proteína transmembrana que actúa como un receptor CD40L constitucionalmente activado, provocando la translocación nuclear de NF- κ B activado y la expresión de BCL-2, MCL1 y otras proteínas antiapoptóticas. Los roles mecanicistas de las otras proteínas EBNA y de los ARN no codificantes en la latencia viral y la transformación de células B no se han caracterizado completamente, pero los estudios genéticos inversos sugieren que, además de EBNA2 y LMP-1, EBNA3A, 3C y LP son necesarios para el crecimiento y

la supervivencia de líneas celulares linfoblastoides B (Longnecker et al., 2013).

Sobre la base de patrones de expresión en células B normales, se han descrito tres programas principales de latencia del VEB, latencia 0 – I, II y III, aunque se han propuesto variaciones de este esquema. La latencia III implica la expresión irrestricta de todos los EBNA, EBER y LMP, siendo muchas de estas proteínas muy inmunogénicas. En la latencia II se expresan EBNA-1, EBER, LMP-1 y LMP-2A y LMP-2B. La latencia 0 – I se observa en las células B en reposo. Las células B infectadas con el VEB, según la fase del ciclo celular en la que se encuentren, pueden no expresar ningún producto génico de EBV (latencia 0) o solo EBNA-1 (latencia I), además de ARN no codificantes. La activación de estos distintos programas transcripcionales está vinculada al uso del promotor, con Wp y Cp conduciendo la expresión de los genes de latencia III y II y Qp conduciendo la expresión solitaria de EBNA1 en la latencia I (Tempera & Lieberman, 2014).

Se han propuesto dos modelos para el establecimiento de una latencia de por vida en células B maduras. El modelo del centro germinal en el que se propone que la infección primaria se produce en células B vírgenes. El programa de latencia III primero estimula la proliferación de células B y la expansión de las células infectadas. Una proporción de las células B transformadas con el VEB ingresa al centro germinal (CG) y cambia al programa de latencia más limitada II (predeterminado), donde LMP-1 y LMP-2A proporcionan señales de supervivencia y diferenciación en células B imitando la señalización mediada por CD40L de las células T colaboradoras y la activación del receptor de células B por el antígeno. A medida que las células B de memoria salen del CG, la expresión del gen del VEB se vuelve aún más restringida (latencia I), para escapar de la vigilancia inmunológica (Roughan & Thorley-Lawson, 2009). En el modelo de infección directa, el VEB infecta la memoria en lugar de las células B vírgenes o induce un fenotipo de memoria sin necesidad de participar en la reacción del CG (Küppers, 2003).

Los programas de transcripción del VEB pueden expresarse de manera diferencial en varios linfomas asociados al VEB. Los linfomas que se

desarrollan en estados inmunodeprimidos como la infección por VIH y después de un trasplante de órganos sólidos o células madre hematopoyéticas, suelen mostrar un programa de latencia III, mientras que los linfomas que se desarrollan en pacientes inmunocompetentes, como el LH y el linfoma de Burkitt (LB), muestran un programa de expresión génica más restringido (latencia II o I, respectivamente). No se ha realizado un análisis sistemático de la expresión génica de latencia en linfomas asociados con el VEB en pacientes inmunocompetentes y puede existir una heterogeneidad significativa inter tumoral e intratumoral. Además, el tipo de latencia del VEB en el linfoma depende no sólo del estado inmunológico del huésped sino también del linaje y diferenciación de las células infectadas. Los LH y LB en pacientes inmunodeprimidos, típicamente conservan un patrón de latencia II y latencia I, respectivamente, en lugar de adquirir una latencia III más permisiva (Gru et al., 2015).

2.3.6 Técnicas de determinación de proteínas mediante inmunohistoquímica (IHQ)

La IHQ es una técnica utilizada para determinar la presencia y el nivel específico de proteínas celulares. Se basa en reacciones inmunoenzimáticas mediante la utilización de anticuerpos monoclonales o policlonales que detectan antígenos celulares en tejidos. Existen diversos métodos de tinción inmunoenzimática utilizados para localizar antígenos relevantes para el diagnóstico, en este caso, oncológico. Las interacciones inmunoenzimáticas pueden visualizarse usando diferentes enzimas como la peroxidasa o la fosfatasa. Un método muy eficaz es el uso de un polímero de dextrano para ampliar la señal de la unión antígeno-anticuerpo, debido a que este polímero lleva conjugados anticuerpos anti-especie (anti-ratón y/o anti-conejo) y moléculas de peroxidasa (García-Caballero & Martín-Lacave, 2012).

2.3.7 Técnicas de determinación de VEB por hibridación in situ con cromógeno (CISH)

CISH es una técnica utilizada para determinar la presencia de una secuencia específica ADN o ARN de una célula determinada. En el caso del VEB, utilizando una sonda complementaria para ARN no codificante del virus

(EBER1 y EBER2), la hibridación de la sonda y el ARN permitirá su identificación con alta sensibilidad.

La Histosonda EBER está indicada para la detección del ARN de EBER 1+2 en células infectadas por el virus de Epstein-Barr tanto en células reactivas como tumorales. Los tumores humanos relacionados con el VEB son numerosos y varían desde el Carcinoma Nasofaríngeo Indiferenciado hasta el Linfoma de Burkitt africano, el Linfoma de Hodgkin celularidad mixta, algunos linfomas B, T y NK y en procesos linfoproliferativos asociados a inmunodeficiencia, así como en ganglios linfáticos de pacientes con patología reactiva atípica producida por mononucleosis infecciosa (Gulley et al., 2002).

2.3.8 Supervivencia o sobrevida global (SG)

La SG es el criterio de valoración principal de referencia para evaluar el resultado de cualquier fármaco, biológico, intervención o procedimiento que en ensayos clínicos oncológicos o en la determinación de algún factor pronóstico. Se reconoce universalmente que la SG es inequívoca, imparcial, con un criterio de valoración definido de importancia clínica primordial, y los resultados positivos proporcionan evidencia confirmatoria de que un tratamiento determinado prolonga la vida de un paciente o que algún factor pronóstico positivo se relaciona a una mayor sobrevida (Driscoll & Rixe, 2009).

2.3.9 Estadio clínico (EC)

La clasificación por estadios de Ann Arbor desarrollada en 1971 es un sistema de cuatro etapas formulado para proporcionar información pronóstica y orientar las decisiones terapéuticas. La actual disponibilidad de modernas técnicas de imagen ha mejorado su aplicabilidad. En 1988, se realizaron revisiones al sistema de estadificación de Ann Arbor. Los principales cambios fueron: el uso de la tomografía computarizada para evaluar la presencia de enfermedad debajo del diafragma. En el estadio II, el número de sitios anatómicos ganglionares se indicó mediante un subíndice (p. Ej., Estadio II3). En el estadio III, el compromiso abdominal superior e inferior se subdividió en III1 y III2, respectivamente. Por último, la enfermedad de gran volumen se denotó por X, definida como más de un tercio de ensanchamiento del mediastino en el nivel T5-6 o > 10 cm de dimensión máxima de la masa nodal.

Se introdujo una remisión completa no confirmada / incierta para indicar la presencia de anomalías residuales en las imágenes, pero con ausencia de enfermedad residual confirmada patológicamente (Ng et al., 2016a).

2.4. VARIABLES

2.4.1 Identificación y definición de la Variable

Expresión del ligando de la proteína de muerte programada 1 (PD-L1): proteína receptora de membrana presente en células hematopoyéticas y no hematopoyéticas con un dominio extracelular canónico tipo inmunoglobulina, responsable de la interacción y señal de traducción hacia los dominios intracelulares. (Krzysztof M. Zak, 2017). Se puede expresar en células tumorales de forma aberrante (Vargas-Rojas et al., 2008).

Expresión de proteína de muerte programada (PD-1): proteína receptor transmembrana tipo I, también denominada CD279 expresada en la superficie de los linfocitos T, B, células asesinas naturales, monocitos y células dendríticas, cuyos ligandos son PD-L1 y PDL-2 (Zak et al., 2017) (Xu-Monette et al., 2018). PD-1 se expresa en forma constitutiva en linfocitos B, T, macrófagos y células dendríticas (Vargas-Rojas et al., 2008).

Determinación del RNA del Virus Epstein Barr (VEB): La presencia del RNA del VEB es un agente oncogénico y está asociado a diversas neoplasias linfoides y epiteliales a través de sus proteínas latentes de membrana LMP2A y LMP1 (El-Sharkawy A, 2018).

Pronóstico de vida: Variable determinada por dos indicadores: la SG, que está determinada por el tiempo de vida desde el diagnóstico inicial o inicio del primer tratamiento, hasta la muerte por cualquier causa (Pilz et al., 2012; Stein, H; Pileri, S; Weiss, 2017), y el EC, que indica el progreso de la enfermedad de manera estratificada. En pacientes con linfoma maligno los estadios I y II son considerados iniciales y los III y IV, avanzados. (Ng et al., 2016b).

2.4.2 Operacionalización de variables

VARIABLE	DEFINICIÓN OPERACIONAL	INDICADORES	CATEGORÍAS / PUNTOS DE CORTE	ESCALA DE MEDICIÓN
Expresión de PD-L1	Proteína punto de chequeo en células neoplásicas. Se determinará mediante IHQ.	Expresión de PD-L1 Tinción de membrana (marrón)	Positivo: $\geq 1\%$ en células neoplásicas Negativo: $< 1\%$ en células neoplásicas. Alta expresión: = o $>$ de 50% Baja expresión: $<$ de 50%	Nominal
Expresión de PD-1	Proteína punto de chequeo en linfocitos. Se determinará mediante IHQ.	Expresión de PD-1 Tinción citoplasmática (marrón)	Alta expresión: $>$ de 15 células positivas por campo de 40X (campo de alto poder CAP) o $>$ de 0.5% del total de linfocitos. Baja expresión: $<$ de 15 células positivas por campo de 40X o $<$ del 0.5% del total de linfocitos.	Nominal
Expresión del ARN del VEB	ARN del VEB. Se medirá mediante CISH/EBER	Expresión de EBER Tinción nuclear (marrón)	Positivo: 1 o más CRS positivas Negativo: ninguna CRS positiva	Nominal
Pronóstico de vida	Tiempo de vida (en años) desde el diagnóstico hasta el fallecimiento.	Sobrevida global	Alta $>$ de 3 años Baja $<$ de 3 años	Nominal
	Estratificación clínica del paciente según la progresión de la enfermedad.	Estadio Clínico	Estadio inicial (I, II) Estadio avanzado (III, IV)	Nominal

CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA

3.1 Tipo y diseño de investigación

El presente estudio es:

- Según el objetivo:
 - Básica
 - Correlacional.
- Según la profundidad:
 - Descriptiva
- Según el tipo de datos:
 - Cuantitativa
- Según la manipulación de variables:
 - No experimental
- Según la temporalidad:
 - Transversal, retrospectiva

3.2 Unidad de análisis.

Muestra tisular (embebida en parafina) correspondiente a biopsia de pacientes diagnosticados con LH en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (INEN).

3.3 Población de estudio

Pacientes diagnosticados con LH en el INEN ingresados entre los años 2015 y 2018.

3.4 Tipo de muestreo

No probabilístico intencional.

3.5 Tamaño de la muestra

El tamaño de la muestra es de 79 biopsias de pacientes con diagnóstico de LH obtenidos de la base de datos del INEN, con información clínica completa y biopsias embebidas en parafina (bloques) disponibles para estudio.

3.6 Selección de la muestra

3.6.1 Criterios de inclusión

- Las HC que tengan un seguimiento del paciente de por lo menos tres años.
- Tener muestras (biopsias embebidas en bloques de parafina) en buen estado de conservación, correspondiente al periodo 2015-2018.

3.6.2 Criterio de exclusión

- Pacientes diagnosticados con otros tipos de linfoma.
- Pacientes con antecedentes de enfermedades inmunológicas.

3.7 Técnica de recolección de datos

3.7.1 Determinación de indicadores biológicos

El material biológico correspondió a muestras tisulares embebidas en parafina. Para el procesamiento de la IHQ y el CISH, se fabricaron bloques

con secciones seleccionadas mediante análisis morfológico de las muestras correspondientes a biopsias de cada caso, ordenándose en filas de 12 muestras problema y 3 casos control por cada bloque o matriz de tejido (TMA). Se realizó la tinción de HE para la evaluación histológica en cada sección de TMA. Luego se realizaron los cortes de los bloques de parafina que contienen las muestras tisulares (TMA) en el micrótopo de rotación Leica (3 micras), Cada corte de TMA fue colocado en una lámina portaobjeto y expuesta a 92°C durante 1 hora, seguidamente se llevó a cabo el protocolo para la determinación proteica de PD-1, PD-L1 y RNA del VEB (Zafra Sierra et al., 2004)

La elaboración de los TMA permite el procesamiento en simultáneo de un gran número de muestras de tejidos los cuales son integrados en un único bloque de parafina, garantizando así la homogeneidad de resultados y una considerable optimización de tiempo y reactivos (Simon et al., 2004).

3.7.2 Determinación de indicadores inmunohistoquímicos: proteína de muerte programada 1 (PD-1) y su ligando (PD-L1).

Para el procesamiento inmunohistoquímico e hibridación in situ con cromógeno se utilizaron los siguientes reactivos:

Inmunohistoquímica (IHQ)	Hibridación In Situ con Cromógeno (CISH)
Recuperador antigénico	Proteinasa K
Peroxidasa	Histosonda EBER
Anticuerpo primario (PD-1, PD-L1)	Anticuerpo Antidigoxina
Amplificador de anticuerpo primario	
Polímero/ HRP	Polímero/ HRP
Diaminobenzidina (DAB)	Diaminobenzidina (DAB)

Los equipos usados fueron:

- Procesador automático de IHQ Autostainer Link 48.
- Equipo de recuperación antigénica (pretratamiento de tejidos) PT-Link.

Las láminas conteniendo las muestras procedentes de los pacientes del estudio y anteriormente colocadas en la estufa a 60°C, fueron sometidas a recuperación antigénica en el equipo de pretratamiento PT-Link (Agilent Dako) y procesador automático de IHQ (Autostainer Link 48, Agilent Dako) para realizar la inmunotinción automatizada, para lo cual se programó los protocolos establecidos para los anticuerpos anti-PD-1 (clona NAT 105) y anti PD-L1 (clona CAL 10). Ambos anticuerpos de Vitro Master Diagnóstica. La recuperación antigénica se realizó mediante incubación de las muestras tisulares en Tris EDTA pH 9.0 por 20 min a 92°C, Se determinó la expresión de PD-1 y PD-L1 mediante IHQ utilizándose la metodología a base de polímeros (Vitro Master Diagnóstica). Los antígenos PD-1 y PD-L1 presentes en las muestras fueron reconocidos por los anticuerpos monoclonales anti-PD-1 y anti PD-L1 mediante incubación por 30 minutos a temperatura ambiente, los complejos antígeno-anticuerpo formados ante la presencia de los antígenos fueron amplificados incubando por 10 min. a temperatura ambiente con el amplificador de anticuerpos (Primary Antibodies Amplifier Vitro Master Diagnóstica) posteriormente estos fueron reconocidos mediante incubación durante 15 min. a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario (Master Polymer Plus HRP Vitro Master Diagnóstica). El revelado de dicha actividad se visualizó mediante una reacción colorimétrica marrón con Diaminobenzidina (DAB Chromogen-Vitro Master Diagnóstica), finalizando con la contratinción utilizando hematoxilina de Harris por 15 segundos y los correspondientes lavados entre paso y paso (Pardo Minda et al., 1998). Se utilizaron muestras control positivo en cada sección de TMA. Se consideró positividad para PD-L1 al visualizarse tinción marrón de membrana en 1% o más de las HRS. Se determinó un punto de 50% o más de positividad de PD-L1 para determinar grupos con alta expresión (50% o más) o baja expresión (menos de 50%). Ver figuras 1 y 2. Se consideró alta expresión de PD-1 cuando se identificó tinción citoplasmática marrón en 15% o más linfocitos del MAT por campo de alto poder (CAP) o >0.5% del total de

linfocitos y baja expresión cuando hubo menos de 15% de expresión por CAP (Ozturk et al., 2020). Ver figuras 3 y 4.

3.7.3 Determinación de indicador molecular: ARN del virus Epstein Barr (VEB)

Se utilizó la técnica de CISH para la determinación del VEB, la cual determina ARN no codificante del virus (EBER 1 y EBER 2). La ISH se fundamenta en la hibridación entre una secuencia de DNA o RNA que se encuentra marcada específicamente (sonda) y la secuencia de DNA o RNA que está presente en la muestra (ARN del VEB) produciéndose la hibridación al haber complementariedad entre estas secuencias. Mediante procedimientos de tinción cromogénica Inmunohistoquímica dirigida hacia el marcador específico de la sonda, la cual es determinado por el DAB- cromógeno se visualizan estos productos híbridos.

Luego de la desparafinación de la muestra se procedió a bloquear la peroxidasa endógena con una solución al 3% de peróxido de hidrógeno. La desproteización se realizó con proteinasa K siguiendo los protocolos establecidos en el Kit CISH EBER (Vitro Master Diagnóstica). Luego se procedió a la incubación con la Histosonda EBER, la misma que detecta EBER 1 y EBER 2 del VEB. La sonda marcada fue hibridada con EBER 1 y EBER 2 y detectada empleando un anticuerpo monoclonal conjugado fosfatasa alcalina-antidigoxina, siguiendo a continuación el protocolo de IHQ previamente descrito. La reacción nuclear positiva, de color marrón oscuro, se visualizó mediante el uso de la sustancia cromogénica diaminobenzidina (DAB). Ver figura 5. Como controles se emplearon casos confirmados positivos y negativos para VEB en cada sección de TMA (Gulley et al., 2002).

3.7.4 Determinación de indicador de pronóstico de vida

Se determinó mediante la SG, y el EC. La SG mide el tiempo en años de un paciente iniciando desde el inicio de diagnóstico hasta la muerte por cualquier causa, dicha información fue obtenida de las HC de los pacientes. (Pilz et al., 2012).

El EC estratificado de Ann Arbor (I, II, III, IV), se determinó de acuerdo con criterios previamente establecidos, que incluyen la presencia de adenopatías en una o más regiones, si éstas están sobre el diafragma o si están sobre y debajo del diafragma y si hay compromiso de órganos no linfoides según los siguientes criterios estipulados en las HC de los pacientes en estudio. (Ng et al., 2016b).

ESTADÍO	DEFINICIÓN
I	Compromiso de un ganglio linfático (I) o un órgano extra linfático (IE)
II	Compromiso de dos o más regiones de ganglios linfáticos en el mismo lado del diafragma (II) o compromiso localizado de un órgano extra linfático y uno o más regiones de ganglios linfáticos en el mismo lado del diafragma (IIE)
III	Compromiso de regiones de ganglios linfáticos en ambos lados del diafragma (III) que pueden estar acompañado por compromiso localizado de un órgano extra linfático en el mismo lado del diafragma (IIIE) o por compromiso del bazo o ambos.
IV	Compromiso difuso de uno o más órganos o tejidos extra linfáticos con o sin compromiso de ganglios linfáticos.

3.8 Análisis e interpretación de la información

Se realizó un análisis descriptivo a través de porcentajes, frecuencias y medidas de resumen (promedio, mínimo y máximo).

En relación con características cuantitativas y las diferencias entre grupos de pacientes, según PD-L1 y PD-1, se evaluaron con la prueba t o su correspondiente prueba no paramétrica (previa evaluación de normalidad). Asociaciones entre grupos de pacientes PD-L1 y PD-1 con características

cualitativas se evaluaron con la prueba Chi-cuadrado, haciendo uso de la corrección de Yates o agrupando categorías de ser el caso.

En cuanto a la estimación de la supervivencia global, el periodo de seguimiento comprendió desde la fecha de ingreso del paciente hasta la fecha de fallecimiento (evento de interés) o ante la pérdida de vista la fecha de última consulta. Los pacientes que no cumplieron con el evento de interés se consideraron como censurados. Las curvas de supervivencia se estimaron con el método de Kaplan-Meier y las diferencias entre curvas se evaluaron con el logrank test.

Un valor $p < 0.05$ se consideró para una diferencia o asociación significativa.

En el análisis se usará el software estadístico SPSS 22.

3.9 Consideraciones éticas

3.9.1 Consentimiento informado

Este trabajo fue presentado al comité de investigación del INEN. En este tipo de estudios retrospectivos básicos, en que se utilizan biopsias embebidas en parafina, previamente realizadas para el diagnóstico, el subcomité de ética del INEN dispone que no se requiere el consentimiento informado de los pacientes debido a que estas investigaciones no tienen una acción directa sobre ellos ni implica una modificación en su estado físico, evaluación y tratamiento.

3.9.2 Confidencialidad de los datos

Los datos de identificación de los pacientes fueron mantenidos en absoluta confidencialidad, utilizando sólo los códigos correspondientes, con acceso únicamente a la investigadora.

3.9.3 Aprobación por el comité de investigación del INEN

Se aprobó el estudio por el comité de investigación del INEN (2021) manteniéndose vigente a fecha actual tal y como lo acredita la copia del documento otorgado por dicho comité y que figura en el anexo 3.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Análisis, presentación y discusión de resultados

Las figuras 1 y 2 muestran imágenes microscópicas de casos de LH con resultados de IHQ para PD-L1 en las células neoplásicas HRS.

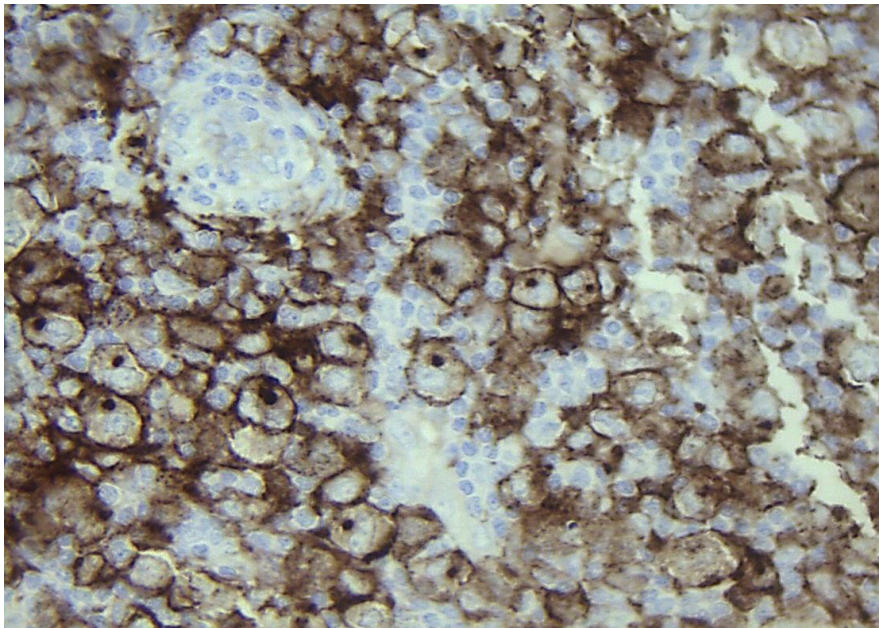


Figura 1. Imagen histológica de uno de los casos del estudio con LHC, en el que se muestra positividad de PD-L1 mediante IHQ en porcentaje mayor al 50% de las HRS (40x)

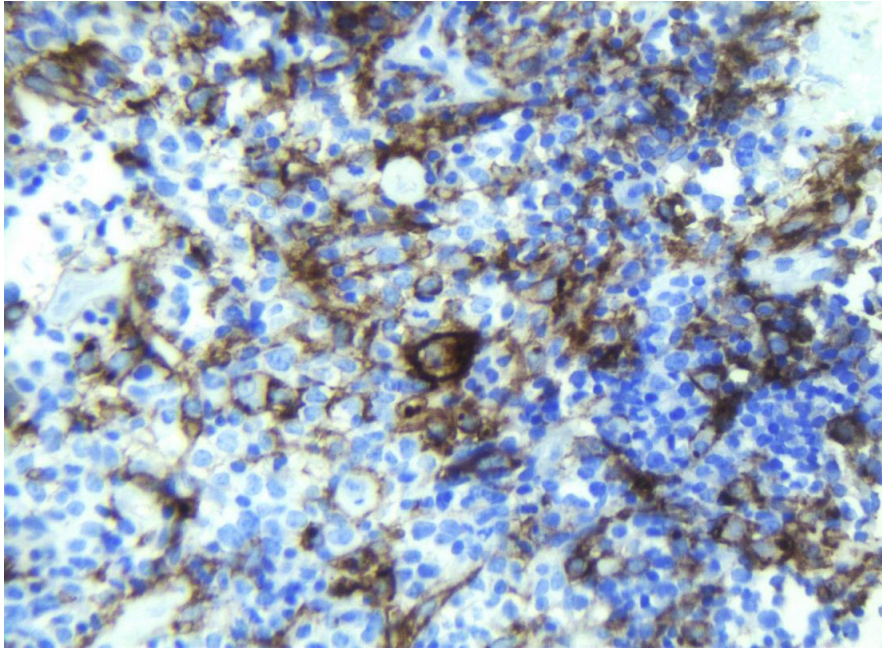


Figura 2. Imagen histológica de uno de los casos del estudio con LHC, en el que se muestra positividad de PD-L1 mediante IHQ en porcentaje menor al 50% de las HRS (40X). Algunos linfocitos también muestran expresión de PD-L1

Las figuras 3 y 4 muestran imágenes microscópicas de casos de LH con resultados de IHQ para PD-1 en los linfocitos del MAT.

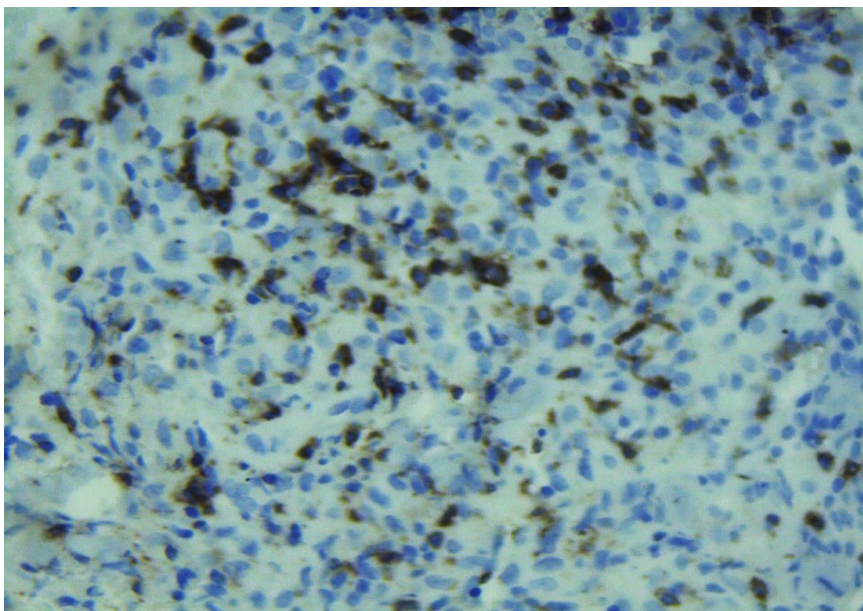


Figura 3. Imagen histológica de uno de los casos del estudio con LHC, en el que se muestra positividad de PD-1 mediante IHQ en más de 15 linfocitos del MAT por CAP. (40X).

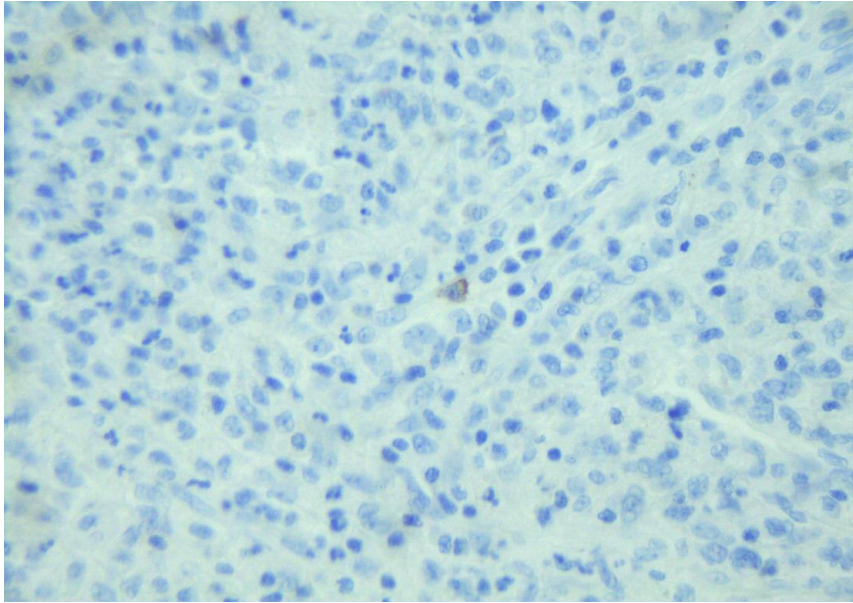


Figura 4. Imagen histológica de uno de los casos del estudio con LHC, en el que se muestra positividad de PD-1 mediante IHQ en menos de 15 linfocitos del MAT por CAP (40X).

La figura 5 muestran la imagen microscópica de un caso de LH con resultado de EBER positivo en células neoplásicas HRS.

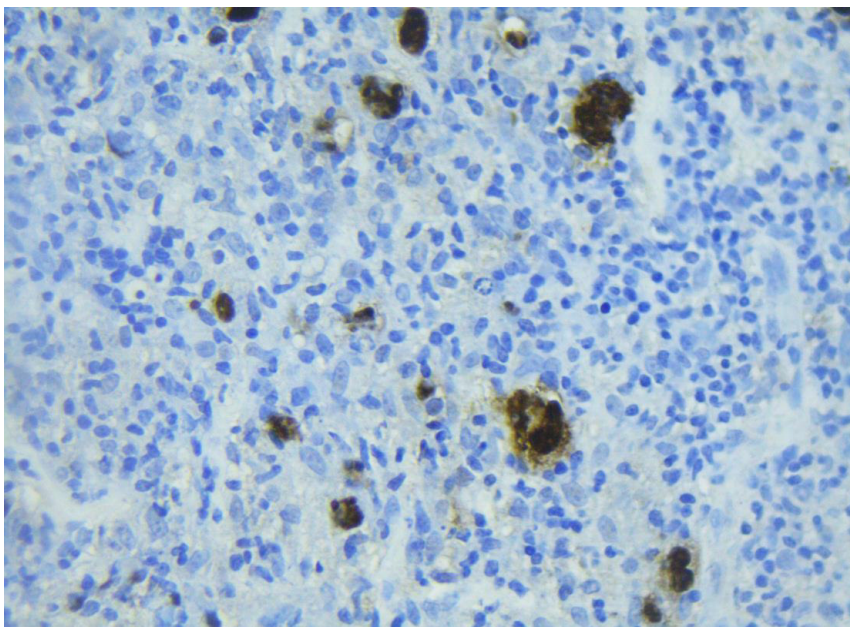


Figura 5. Imagen histológica de un caso de LHC que muestra positividad para VEB mediante CISH EBER (40X).

La edad promedio de los 79 pacientes del estudio fue de 33.3 años, (4 a 84); el 65.8% (N=52) de pacientes son hombres y el 34.2% (N=27) son mujeres; otras características de los pacientes en estudio se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Características de los pacientes en el estudio.

	N (%)
Edad, años	
Promedio [Min-Max]	33.3 [4-84]
Sexo	
Hombres	52 (65.8)
Mujeres	27 (34.2)
Localización	
Cervical	60 (75.9)
Mediastinal	58 (73.4)
Retroperitoneal	40 (50.6)
Axilar	34 (43.0)
Bazo	19 (24.1)
MO	14 (17.7)
Hueso	12 (15.2)
Hígado	11 (13.9)
Inguinal	7 (8.9)
Intra abdominal	7 (8.9)
Iliaca	4 (5.1)
Orbitario	2 (2.5)
Orofaringe	1 (1.3)
Pleura	1 (1.3)
Partes blandas	1 (1.3)

Estadio clínico	
I	3 (3.8)
II	17 (21.5)
III	23 (29.1)
IV	34 (43.0)
Sin registro	2 (2.5)
Quimioterapia	
No	14 (17.7)
QT	51 (64.6)
QT+TPH	7 (8.9)
QT+RT	1 (1.3)
TPH autólogo y alogénico	1 (1.3)
Sin registro	5 (6.3)
Subtipo histológico	
EN	23 (29.1)
CM	15 (19.0)
RL	3 (3.8)
DL	1 (1.3)
PLN	1 (1.3)
Sin registro	36 (45.6)
PDL-1	
<50%	11 (13.9)
≥50%	64 (81.0)
Sin registro	4 (5.1)
PD-1	
<15 x CAP	60 (75.9)
≥15 x CAP	16 (20.3)

Sin registro	3 (3.8)
EBER	
Negativo	45 (57.0)
Positivo	34 (43.0)

En el presente estudio se documentaron 21 (26.6%) fallecimientos. La supervivencia global en el grupo de pacientes con PD-L1 menor al 50% se estimó a los 12, 36 y 60 meses en 90.9%, 79.5% y 63.6%, respectivamente, y en el grupo con PD-L1 mayor o igual que 50% se estimó en 80.7%, 78.6% y 61.3%, respectivamente. La mediana del tiempo de supervivencia se estimó en 128 meses en el grupo PD-L1 menor que 50% y en el grupo con PD-L1 mayor o igual que 50% no se pudo estimar. En el estudio no se encontró una diferencia significativa en la supervivencia global según los grupos de PD-L1 (ver Figura 6).

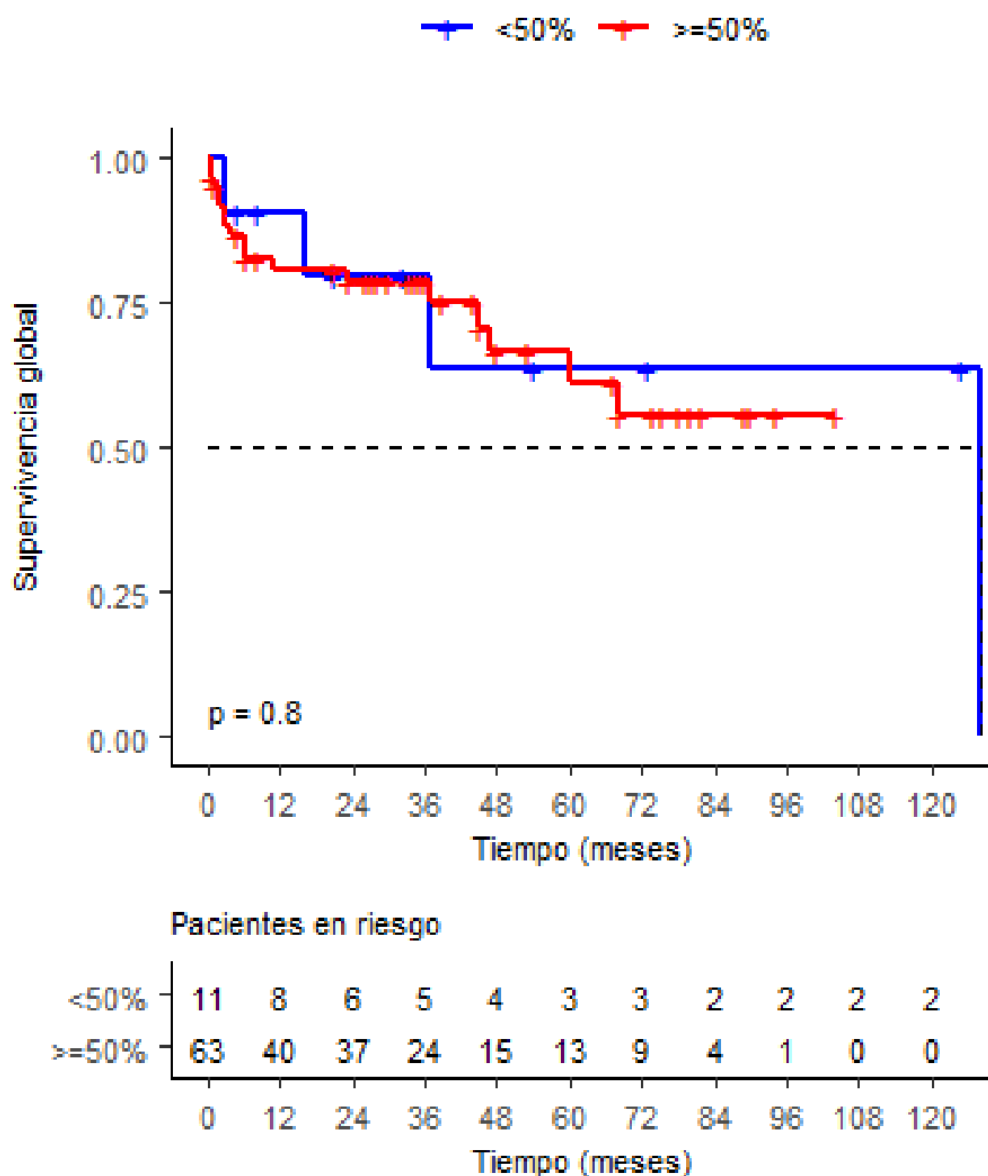


Figura 6. Curvas de la supervivencia global estimada según PD-L1.

En la Tabla 2 se muestra la relación de los grupos PD-L1 menor que 50% y mayor o igual que 50% con la edad, el sexo, el estadio clínico y el EBER. Se observa que ambos grupos de pacientes son comparables respecto a la edad, el sexo y el estadio clínico. Se encontró una asociación significativa de los grupos PD-L1 con el EBER, se observa una mayor proporción de pacientes EBER positivo en el grupo PD-L1 mayor o igual que 50% que en el grupo PD-L1 menor que 50% (50.0% vs 9.1%, respectivamente).

Tabla 2. PD-L1 y características de los pacientes en el estudio.

	PD-L1		p
	<50%	≥50%	
Edad, años			
Promedio [Min-Max]	31.8 [5-78]	32.6 [4-84]	0.905
Sexo			
Mujeres	3 (27.3)	22 (34.4)	
Hombres	8 (72.7)	42 (65.6)	0.908
Estadio clínico			
I-II	3 (27.3)	16 (25.8)	
III-IV	8 (72.7)	46 (74.2)	1.000
EBER			
Negativo	10 (90.9)	32 (50.0)	
Positivo	1 (9.1)	32 (50.0)	0.028

La SG en pacientes con PD-1 menor que 15 x CAP se estimó a los 12, 36 y 60 meses en 81.4%, 79.2% y 65.2%, respectivamente, y en el grupo con PD-1 mayor o igual que 15 x CAP se estimó en 93.8%, 85.2% y 60.9%, respectivamente. La mediana del tiempo de supervivencia en el grupo con PD-1 menor que 15 x CAP se estimó en 128 meses y en el grupo con PD-1 mayor o igual que 15 x CAP se estimó en 68 meses. No se encontró una diferencia significativa en la supervivencia global según los grupos de PD-1 (ver Figura 7).

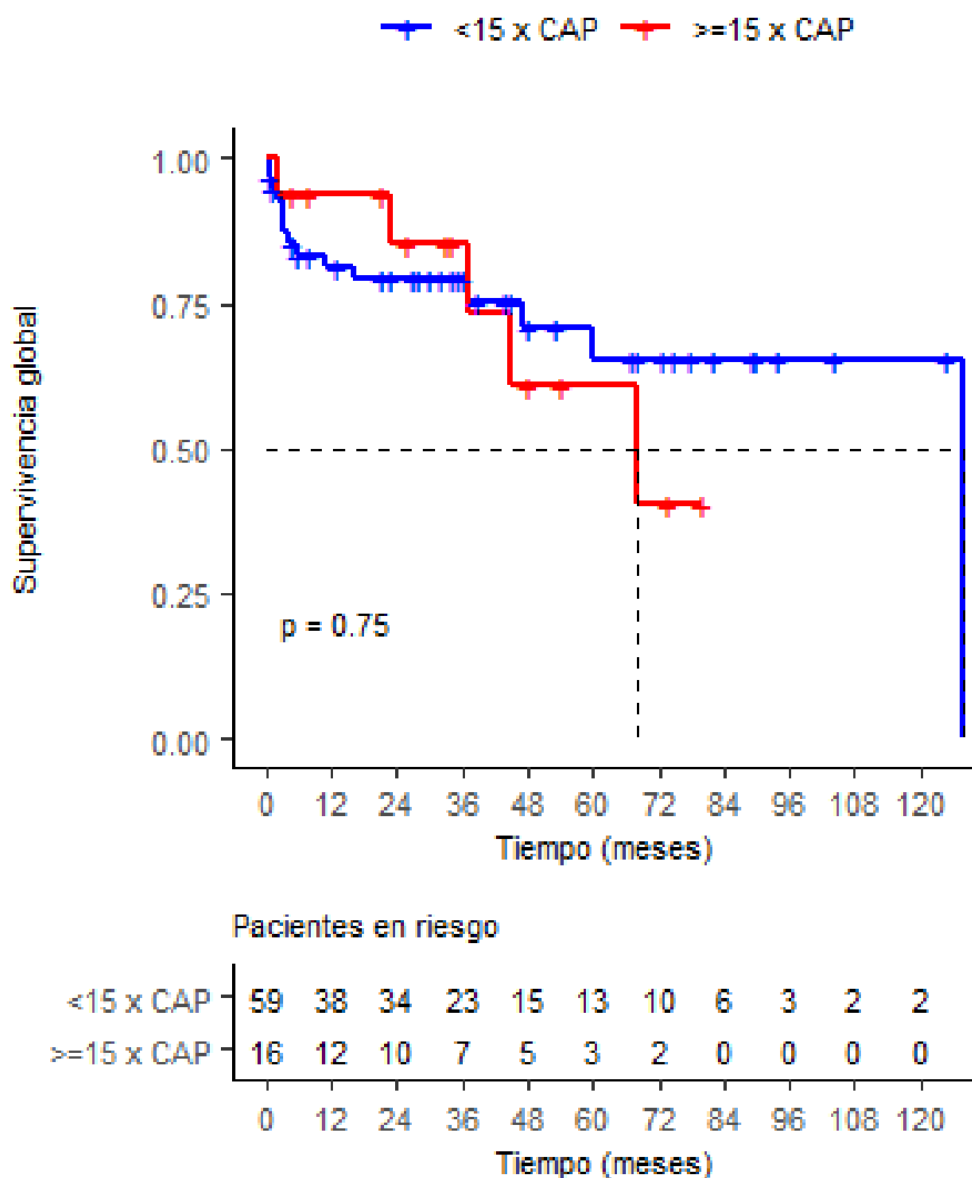


Figura 7. Curvas de la supervivencia global estimada según PD-1.

En la Tabla 3 se muestra la relación de los grupos PD-1 menor que 15 x CAP y mayor o igual que 15 x CAP con la edad, el sexo, el estadio clínico y el EBER. Se observa que ambos grupos de pacientes son comparables respecto al sexo y el estadio clínico. Se encontró una diferencia significativa entre ambos grupos respecto a la edad, los pacientes del grupo con PD-1 menor que 15 x CAP tienen significativamente mayor edad que los pacientes del grupo PD-1 mayor o igual 15 x CAP (edad promedio de 34.5 años vs 25.4 años, respectivamente). Se encontró una asociación significativa de los grupos PD-1 con el EBER, se observa una mayor proporción de pacientes

EBER positivo en el grupo PD-1 menor que 15 x CAP que en el grupo PD-1 mayor o igual que 15 x CAP (53.3% vs 6.3%, respectivamente).

Tabla 3. PD-1 y características de los pacientes.

	PD-1		p
	<15 x CAP	≥15 x CAP	
Edad, años			
Promedio [Min-Max]	34.5 [4-84]	25.4 [4-74]	0.044
Sexo			
Mujeres	19 (31.7)	6 (37.5)	
Hombres	41 (68.3)	10 (62.5)	0.659
Estadio clínico			
I-II	13 (22.4)	7 (43.8)	
III-IV	45 (77.6)	9 (56.3)	0.167
EBER			
Negativo	28 (46.7)	15 (93.8)	
Positivo	32 (53.3)	1 (6.3)	0.001

En la Tabla 4 se muestra, para el total de pacientes con registros de PD-L1 y PD-1, que 9 (12.2%) pacientes tienen valores bajos de PD-L1 y PD-1 (<50% y <15 x CAP, respectivamente), 13 (17.6%) pacientes tienen valores altos de PD-L1 y PD-1 (≥50% y ≥15 x CAP, respectivamente), 2 (2.7%) pacientes tienen valores bajos de PD-L1 y valores altos de PD-1 (<50% y ≥15 x CAP, respectivamente) y 50 (67.6%) pacientes tienen valores altos de PD-L1 y valores bajos de PD-1 (≥50% y <15 x CAP, respectivamente).

Tabla 4. Pacientes según PD-L1 y PD-1.

PD-L1	PD-1		Total
	<15 x CAP	≥15 x CAP	
<50%	9 (12.2)	2 (2.7)	11 (14.9)
≥50%	50 (67.6)	13 (17.6)	63 (85.1)
Total	59 (79.7)	15 (20.3)	74 (100.0)

4.2. Pruebas de hipótesis

4.2.1 PD-L1 y SG

<p>Hipótesis:</p> <p>H0: No existe relación entre la expresión de PD-L1 en HRS y SG en pacientes peruanos con diagnóstico de LH en el periodo 2015-2018.</p> <p>H1: Existe relación entre la expresión de PD-L1 en HRS y SG en pacientes peruanos con diagnóstico de LH en el periodo 2015-2018.</p>
<p>Nivel de significancia:</p> <p>Nivel de significancia (alfa) < 0.05 (5% en término de probabilidades)</p>
<p>Estadística de prueba:</p> <p>Chi cuadrado</p>
<p>Nivel de P:</p> <p>p = 0.8</p> <p>Dado que el valor p (0.8) es mayor que el nivel de significancia (0.05), entonces se acepta la hipótesis nula con un margen de error de 5%.</p>
<p>Decisión:</p> <p>No existe relación entre la expresión de PD-L1 y la SG en pacientes peruanos con diagnóstico de LH en el periodo 2015-2018.</p>

4.2.2 PD-1 y SG

Hipótesis: H0: No existe relación entre la expresión de PD-1 en los linfocitos del MAT y la SG en pacientes peruanos con diagnóstico de LH en el periodo 2015-2018. H1: Existe relación entre la expresión de PD-1 en los linfocitos del MAT y la SG de pacientes diagnosticados con LH en el periodo 2015-2018.
Nivel de significancia: Nivel de significancia (alfa) < 0.05 (5% en términos de probabilidades)
Estadística de prueba: Chi cuadrado
Nivel de P: p = 0.75 Dado que el valor p (0.75) es mayor que el nivel de significancia (0.05), entonces se acepta la hipótesis nula con un margen de error de 5%.
Decisión: No existe relación entre la expresión de PD-1 en los linfocitos del MAT y la SG de pacientes peruanos diagnosticados con LH en el periodo 2015-2018.

4.2.3 PD-L1 y VEB

Hipótesis:

H0: No existe relación entre la expresión de PD-L1 en las HRS y la infección por VEB en pacientes peruanos con diagnóstico de LH en el periodo 2015-2018.

H1: Existe relación entre la expresión de PD-L1 en las HRS y la infección por VEB en pacientes peruanos con diagnóstico de LH en el periodo 2015-2018.

Nivel de significancia:

Nivel de significancia (alfa) < 0.05 (5%)

Estadística de prueba:

Chi cuadrado

Nivel de P:

p = 0.028

Dado que el valor de p (0.028) es menor que el nivel de significancia (0.05), entonces se rechaza la hipótesis nula con un margen de error de 5%.

Decisión:

Existe relación entre la expresión de PD-L1 en las HRS y la infección por VEB en pacientes peruanos con diagnóstico de LH en el periodo 2015-2018.

4.2.4 PD-1 y VEB

<p>Hipótesis:</p> <p>H0: No existe relación inversa entre la expresión de PD-1 en los linfocitos del MAT y la infección por VEB en pacientes peruanos con diagnóstico de LH en el periodo 2015-2018.</p> <p>H1: Existe relación inversa entre la expresión de PD-1 en los linfocitos del MAT y la infección por VEB en pacientes peruanos con diagnóstico de LH en el periodo 2015-2018.</p>
<p>Nivel de significancia:</p> <p>Nivel de significancia (alfa) < 0.05 (5% en término de probabilidades)</p>
<p>Estadística de prueba:</p> <p>Chi cuadrado</p>
<p>Nivel de P:</p> <p>p = 0.001</p> <p>Dado que el valor de p (0.01) es menor que el nivel de significancia (0.05), entonces se rechaza la hipótesis nula con un margen de error de 5%.</p>
<p>Decisión:</p> <p>Existe relación inversa entre la expresión de PD-1 en los linfocitos del MAT y la infección por VEB en pacientes peruanos con diagnóstico de LH en el periodo 2015-2018.</p>

4.3 Discusión

En la presente investigación, todos los pacientes fueron tratados con quimioterapia, sin embargo, hay que recalcar que se realizaron las biopsias antes del tratamiento. A diferencia de otros estudios, en que la positividad de PD-L1 en las HRS es variable, en la presente investigación, se encontró la expresión en todos los casos evaluados, evidenciándose que en el 81% de dichos casos, hubo 50% o más de positividad. En la investigación de Hollander y colaboradores, se evaluó la positividad de PD-L1 en HRS en biopsias pre y postratamiento, encontrando un significativo incremento de la expresión en estos con expresión de PD-L1 de 87%. Por otra parte, todos los casos recurrentes expresaron PD-L1 (Hollander et al., 2018). Se ha postulado que esta regulación al alza estaría relacionada a mecanismos genéticos (como la alteración en la región 9p24.1 del cromosoma 9) ocasionados por el tratamiento antineoplásico, (Roemer et al., 2016). Otra publicación, también reportó un aumento de PD-L1 en las HRS post tratamiento, pero con menor positividad, encontrándose que 18% de los casos expresaron PD-L1 antes del tratamiento, en contraste con el 47% que evidenció positividad postratamiento (Paydas et al., 2015). La peculiaridad de nuestros hallazgos en este estudio radica en que todos los casos fueron altamente positivos para PD-L1 (81%), con biopsias tomadas previamente al tratamiento. Esto indica que, en los pacientes del presente estudio, presentan alteración en la regulación de PD-L1 antes del tratamiento o su posible recidiva.

Se ha reportado que en pacientes con LHC con enfermedad refractaria o recidivante, tratamientos con inhibidores de PD-1 resultan en altas tasas de respuesta (Ansell et al., 2015; Armand et al., 2016; Younes et al., 2016). Las elevadas expresiones de PD-L1 y/o PD-L2 se explicaría por la amplificación de la región del cromosoma 9p24.19 y por la activación de AP-110 por las HRS, estimulando la ruta de JAK-STAT (Ansell et al., 2015; Jalali et al., 2019; Steidl et al., 2010). La respuesta terapéutica al bloqueo de PD-1 en LHC se explicaría por la interrupción de la interacción PD-1/PD-L1 o PD-L2, esto daría inicio a una cascada de eventos de señalización que desencadena una respuesta celular inmunitaria eficaz contra las células tumorales (Keir et al., 2008).

Por otro lado, al evaluar el suero de pacientes con LHC, encontraron un incremento de la forma soluble de PD-1, en comparación con los sujetos sin enfermedad, así mismo plantean que PD-1 soluble tiene la capacidad de inducir la señalización inversa de PD-L1 en líneas celulares de LHC y el tratamiento con anti-PD-1 podría revertir este efecto, por lo que, sugirieron que hay un mecanismo de importancia biológica y funcional en relación con estas formas solubles. Los efectos de los bloqueadores de PD-1 en pacientes con LHC podrían estar mediados por el bloqueo de la fosforilación oxidativa mitocondrial de las HRS, debido a que el metabolismo energético de las HRS es altamente dependiente de la fosforilación oxidativa. Probablemente la señalización inversa PD-L1 también juega un papel importante en este proceso (Birkenmeier et al., 2016; Jalali et al., 2019).

En esta investigación luego de comparar dos grupos con punto de corte en 50% de positividad, no demostró asociación con edad, sexo, EC, ni SG en referencia a la expresión de PDL-1 en las HRS, corroborándose lo mencionado en otros reportes (Hollander et al., 2018; Volaric et al., 2020). Estudios con elevada expresión (97%) de PD-L1 en las HRS del LHC, revelan alteraciones concordantes de los loci PD-L1 y PD-L2 (polisomía, ganancia de copia, amplificación), asociándose esto a la expresión de PD-L1 y las alteraciones genéticas en pacientes con amplificación en la región 9p24.1 siendo para estos, la supervivencia libre de progresión, significativamente más corta (Roemer 2016). En pacientes con neoplasia avanzada la incidencia y amplificación de la región 9p24.1 se vieron incrementadas postulándose que la expresión de PD-L1 en las HRS y de PD-1 en las células inflamatorias del MAT tienen un rol relevante para la identificación de pacientes con LHC de alto riesgo (Greaves et al., 2011). Otra consideración destacable de la presente investigación es que los casos que expresaron 50% o más de PD-L1, mostraron una expresión de PD-1 disminuida en los linfocitos del MAT (67.6% con menos de 15 linfocitos con expresión de PD-1 por CAP), lo que coincide con lo encontrado en otros reportes (Paydas 2018; Hollander 2017, Hollander 2018; Greaves 2011). Una característica peculiar del LHC es que las HRS representan un bajo porcentaje celular del tejido afectado pues la mayoría de las células corresponde a células inflamatorias. Siendo PD-1 un

análogo de CD28 expresado en células T, su actividad citotóxica es inhibida en células neoplásicas mediante la interacción con PD-L1, que es un análogo de B7. Esta proteína está regulada al alza en células inmunes y no inmunes, incluidas las células malignas. Como se mencionó, la inmunosupresión a través de PD1/PD-L1, contribuye a una respuesta inmune fallida en algunos tumores (Keir et al., 2008). En la supervivencia de las células B del centro germinal la interacción PD1/PD-L1 también es de importancia (Good-Jacobson et al., 2010). En estudios realizados por Greaves, se determinó la variabilidad de la expresión de PD-1 y PDL-1 al momento del diagnóstico de LHC. En la mayoría de los casos la expresión de PD-1 fue baja o ausente en el MAT y los pocos pacientes con expresión de PD-1 elevada presentaron una evolución clínica desfavorable. En contraste hubo elevada expresión de PD-L1 tanto en HRS como en las células del MAT, aunque en estas últimas no se mostró asociación con el cuadro clínico, concluyendo que PD-1 puede tener importancia biológica, en una minoría de pacientes con LH, asociándose la sobreexpresión con una mayor probabilidad de baja supervivencia (Greaves et al., 2011). En este estudio no se evidencia asociación de PD-1 con la SG ni con las características clínicas, aunque sí se observó que los pacientes del grupo etario de mayor edad (promedio 34.5 años) tuvieron baja o nula expresión de PD-1 en los linfocitos del MAT. Al respecto, se ha informado recientemente en estudios preclínicos la disminución del sistema inmunitario relacionada con la edad, denominada inmunosenescencia (Elias et al., 2016, 2017). Se ha descrito que las células T, los principales efectores de la respuesta antitumoral, experimentan cambios significativos con la edad. En ese sentido, los linfocitos T CD8+ vírgenes disminuyen con el incremento de edad, debido a la involución del timo y la contracción de las células madre linfopoyéticas (Tomihara et al., 2013) y la disminución de la expresión de CD28 en la superficie de los linfocitos T CD8+ provoca una disminución de la activación inmunitaria (Czesnikiewicz-Guzik et al., 2008; Filaci et al., 2004; Weng et al., 2009). En la presente investigación, no se evaluaron los linfocitos infiltrantes de tumores (TIL), sin embargo, es un aspecto que debe considerarse ya que, se ha encontrado que los niveles de PD-1 en estos TIL en pacientes con LH, presentan mayor expresión que la observada en linfocitos de individuos voluntarios sanos (Yamamoto et al., 2008). El incremento de los TIL con PD-

1+ se asocia con peor pronóstico en pacientes diagnosticados con LH (Greaves et al., 2013; Muenst et al., 2009).

Un interesante estudio de Volaric y colaboradores tuvo como objetivo determinar la utilidad diagnóstica de PD-L1 y PD-1 en biopsias con aguja en pacientes con LHC y en biopsias de ganglios linfáticos no neoplásicos. Los casos con LHC tuvieron mayor expresión de PD-L1 en las HRS, lo que no se observó en ninguna célula linfoide de los ganglios no tumorales. También observaron baja expresión de PD-1 en los linfocitos del MAT de LHC en comparación con los linfocitos de los ganglios reactivos. La utilidad de este hallazgo radica que en casos de biopsias pequeñas en que se identifican células sospechosas que corresponden a HRS, la positividad de PD-L1 y la baja expresión de PD-1 en los linfocitos del MAT estarían a favor del diagnóstico de LHC (Volaric et al., 2020).

Otro hallazgo importante es la asociación significativa entre la expresión de PD-L1 en la HRS, la expresión de PD-1 con los linfocitos del MAT y la infección de las células neoplásicas por el VEB. Se encontró una mayor proporción de pacientes EBER positivo en el grupo PD-L1 mayor o igual a 50% y una mayor proporción de pacientes EBER positivo en el grupo PD-1 menor que 15 x CAP. En el estudio de Green y colaboradores, se observó una relación mutuamente excluyente entre la infección por VEB y la amplificación de la región 9p24.1, sugiriendo mecanismos alternativos de inducción de PD-L1 (Green et al., 2012). Por otro lado, el análisis de elementos reguladores de PD-L1 reveló un elemento potenciador con sitios de unión AP-1 en tándem. AP-1 es constitutivamente activo en LHC y las células HRS expresan niveles altos tanto de cJUN como de JUN-B, componentes de AP-1 (Mathas et al., 2002; Rodig et al., 2008). Por otro lado, la inhibición de cJUN disminuyó la expresión de PD-L1. Estos resultados definen un mecanismo adicional dependiente de AP-1 para la expresión de PD-L1 en LHC. Apoyando esta hipótesis, Green y colaboradores encontraron una fuerte expresión de PD-L1 en líneas de células B linfoblásticas transformadas por VEB (LCL) y actividad tanto del potenciador de PD-L1 en estas células. Además, el antígeno codificado por VEB, LMP1, aumentó el promotor de PD-L1 y más del 70 % de los desórdenes linfoproliferativos postrasplantes (DLPT) asociados a VEB expresaron PD-L1

en las células B. Estos hallazgos son de interés adicional dada la expresión del receptor PD-1 en células T CD8 + específicas de VEB (Greenough et al., 2010). En análisis previos de hibridación genómica comparativa, no se identificó amplificación de la región 9p24.1 en DLPT EBV+ (Poirel et al., 2005; Rinaldi et al., 2006), lo que respalda aún más la idea de que la infección por VEB y la ganancia de copias de la región 9p24.1 representan mecanismos alternativos de inducción de PD-L1. Por otro lado, Green y colaboradores encontraron que las LCL expresaron niveles más altos de las proteínas STAT asociadas a JAK-3 y la inhibición química de JAK3 disminuyó la expresión de PDL1. Estos hallazgos resaltan mecanismos alternativos de inducción de PD-L1 mediada por JAK/STAT que pueden ser operativos en LHC VEB+. Se han descrito bases moleculares adicionales de activación de JAK en los LHC, como mutaciones de SOCS-1 (Weniger et al., 2006), regulación a la baja de miR-135a (Navarro et al., 2009) y reordenamientos raros de JAK2 (Van Roosbroeck et al., 2011). Los mecanismos adicionales de inducción de PD-L1, activación de AP-1 e infección por VEB amplían el grupo de LHC que pueden ser susceptibles al bloqueo de PD-1. Además, otros estudios demuestran que la activación de AP-1 y la infección por VEB inducen la expresión de dos moléculas inmunorreguladoras, galectina-1 y PD-L1, que limitan las respuestas de células T antitumorales por mecanismos diferentes y potencialmente complementarios (Armand et al., 2016; Juszczynski et al., 2007; Ouyang et al., 2011; Rodig et al., 2008). Estos datos resaltan la existencia de mecanismos sinérgicos dependientes de AP-1 de tumor, evasión inmune y sugieren enfoques adicionales a la inmunoterapia dirigida combinada. Por otro parte, la asociación entre la infección por VEB y la menor expresión de PD-1 en los linfocitos del MAT podría explicarse por mecanismos complejos aun no bien comprendidos pero que contribuirían al bloqueo de la respuesta linfocítica inmunitaria, disminuyendo los linfocitos del MAT e incrementando la expresión de PD-L1 (Biggi & Elgui de Oliveira, 2022; Ozturk et al., 2020).

Finalmente, el interesante reporte de Ozturk y colaboradores definió pacientes con LHC triple positivos (VEB, PD-L1 en HRS y PD-1 en linfocitos del MAT), como pacientes de muy alto riesgo. Sus resultados mostraron que la SG se

acortó significativamente en casos de LHC triple positivos, asociándose además con enfermedad en estado avanzado, puntuación IPS alta y mayor compromiso extraganglionar (Ozturk et al., 2020). En la presente investigación no se realizó esta determinación debido a posibles sesgos por la no uniformidad de los tratamientos y por la poca casuística. Aunque nuestros resultados son similares a los encontrados en otros estudios en cuanto al impacto pronóstico en SG de PD-L1 y PD-1 (Biggi & Elgui de Oliveira, 2022; Green et al., 2012; Merryman & Reid, 2017; Ozturk et al., 2020; Paydas et al., 2015; Sakakida et al., 2020), una nueva investigación prospectiva, con mayor número de pacientes y mayor uniformidad en los tratamientos, confirmaría nuestros hallazgos y evaluaría el valor pronóstico y predictivo de los LHC triple positivos. Una utilidad práctica de nuestros hallazgos es el hecho peculiar de que todos nuestros casos expresan PD-L1 en las HRS. Este hallazgo podría tener influencia en ensayos clínicos para evaluar la respuesta de tratamientos inmunológicos con anti-PD-1 en los pacientes con LHC.

CONCLUSIONES

1. Todos los casos de LHC estudiados presentaron expresión de PD-L1 en las HRS en porcentaje variable.
2. 81% de los casos con positividad de PD-L1 en las HRS tuvieron alta expresión (50% o más), no encontrándose asociación de la expresión de PD-L1 con la edad, sexo, SG o EC.
3. 75.9 % de los linfocitos del MAT tuvieron baja expresión de PD-1, no encontrándose asociación entre la expresión de PD-1 con el sexo, SG o EC.
4. Hubo asociación significativa entre el grupo etario de mayor edad con nula o disminuida expresión de PD-1 en los linfocitos del MAT.
5. Hubo asociación significativa de alta expresión de PD-L1 en HRS y nula o disminuida expresión de PD-1 en los linfocitos del MAT con la identificación de VEB en las células HRS.

RECOMENDACIONES:

1. Teniendo en cuenta la buena respuesta de los tratamientos inmunológicos con inhibidores de PD-1 y PD-L1 en diversas neoplasias malignas, así como la elevada positividad de la expresión de PD-L1 en la HRS de los pacientes evaluados, es recomendable determinar la presencia de estas proteínas mediante IHQ en casos de LHC y realizar un ensayo clínico con estos inhibidores.
2. Es recomendable determinar la presencia del VEB en los pacientes con LHC teniendo en cuenta su rol en la desregulación del eje PD-1/PD-L1.
3. Debe realizarse un estudio prospectivo de la expresión de PD-1 en los linfocitos del MAT, PD-L1 en las HRS y VEB en la HRS en casos de LHC, con mayor número de casos y con tratamientos uniformes para evaluar el impacto en la SG, la sobrevida libre de fallas, la respuesta al tratamiento convencional y a la inmunoterapia con inhibidores de PD-1 y PD-L1, debiéndose identificar los casos de LHC triple positivos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- Allen, P. B., & Gordon, L. I. (2017). Frontline Therapy for Classical Hodgkin Lymphoma by Stage and Prognostic Factors. *Clinical Medicine Insights. Oncology*, 11, 1179554917731072. <https://doi.org/10.1177/1179554917731072>
- Ansell, S. M., Lesokhin, A. M., Borrello, I., Halwani, A., Scott, E. C., Gutierrez, M., Schuster, S. J., Millenson, M. M., Cattry, D., Freeman, G. J., Rodig, S. J., Chapuy, B., Ligon, A. H., Zhu, L., Grosso, J. F., Kim, S. Y., Timmerman, J. M., Shipp, M. A., & Armand, P. (2015). PD-1 blockade with nivolumab in relapsed or refractory Hodgkin's lymphoma. *The New England Journal of Medicine*, 372(4), 311–319. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1411087>
- Armand, P., Shipp, M. A., Ribrag, V., Michot, J.-M., Zinzani, P. L., Kuruvilla, J., Snyder, E. S., Ricart, A. D., Balakumaran, A., Rose, S., & Moskowitz, C. H. (2016). Programmed Death-1 Blockade With Pembrolizumab in Patients With Classical Hodgkin Lymphoma After Brentuximab Vedotin Failure. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 34(31), 3733–3739. <https://doi.org/10.1200/JCO.2016.67.3467>
- Biggi, A. F. B., & Elgui de Oliveira, D. (2022). The Epstein - Barr virus Hacks Immune Checkpoints: Evidence and Consequences for Lymphoproliferative Disorders and Cancers. *Biomolecules*, 12(3). <https://doi.org/10.3390/biom12030397>
- Birkenmeier, K., Dröse, S., Wittig, I., Winkelmann, R., Käfer, V., Döring, C., Hartmann, S., Wenz, T., Reichert, A. S., Brandt, U., & Hansmann, M.-L. (2016). Hodgkin and Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin lymphoma are highly dependent on oxidative phosphorylation. *International Journal of Cancer*, 138(9), 2231–2246. <https://doi.org/10.1002/ijc.29934>
- Czesnikiewicz-Guzik, M., Lee, W. W., Cui, D., Hiruma, Y., Lamar, D. L., Yang, Z. Z., Ouslander, J. G., Weyand, C. M., & Goronzy, J. J. (2008). T cell subset-specific susceptibility to aging. *Clinical Immunology*, 127(1), 107–118.

- da Silva, P. B., Real, J. M., Ferreira, L. R. P., Esteves, G. H., Brito, F. do N., & Baiocchi, O. C. G. (2018). Soluble PD-1 and PD-L1 as potential biomarkers for classical Hodgkin lymphoma. In *Hematological oncology* (Vol. 36, Issue 4, pp. 709–712). <https://doi.org/10.1002/hon.2542>
- De Re, V., Caggiari, L., Repetto, O., Mussolin, L., & Mascarin, M. (2019). Classical Hodgkin 's Lymphoma in the Era of Immune Checkpoint Inhibition. *Journal of Clinical Medicine*, 8(10). <https://doi.org/10.3390/jcm8101596>
- Driscoll, J. J., & Rixe, O. (2009). Overall survival: still the gold standard: why overall survival remains the definitive end in cancer clinical trials. *Cancer Journal (Sudbury, Mass.)*, 15(5), 401–405. <https://doi.org/10.1097/PPO.0b013e3181bdc2e0>
- Elias, R., Karantanos, T., Sira, E., & Hartshorn, K. L. (2017). Immunotherapy comes of age: Immune aging & checkpoint inhibitors. *Journal of Geriatric Oncology*, 8(3), 229–235. <https://doi.org/10.1016/j.jgo.2017.02.001>
- Elias, R., Morales, J., Rehman, Y., & Khurshid, H. (2016). Immune Checkpoint Inhibitors in Older Adults. *Current Oncology Reports*, 18(8), 47. <https://doi.org/10.1007/s11912-016-0534-9>
- Epstein, M. A., Achong, B. G., & Barr, Y. M. (1964). Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt 's lymphoma. *Lancet (London, England)*, 1(7335), 702–703. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(64\)91524-7](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(64)91524-7)
- Filaci, G., Fravega, M., Negrini, S., Procopio, F., Fenoglio, D., Rizzi, M., Brenci, S., Contini, P., Olive, D., Ghio, M., Setti, M., Accolla, R. S., Puppo, F., & Indiveri, F. (2004). Nonantigen specific CD8 + T suppressor lymphocytes originate from CD8+CD28- T cells and inhibit both T-cell proliferation and CTL function. *Human Immunology*, 65(2), 142–156. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2003.12.001>
- Galon, J., & Bruni, D. (2020). Tumor Immunology and Tumor Evolution: Intertwined Histories. *Immunity*, 52(1), 55–81. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.12.018>
- García-Caballero, T., & Martín-Lacave, I. (2012). *Atlas de Inmunohistoquímica: Caracterización de células, tejidos y órganos normales* (S. A. Ediciones Díaz de Santos (ed.); Primera Ed).
- Good-Jacobson, K. L., Szumilas, C. G., Chen, L., Sharpe, A. H., Tomayko, M. M., & Shlomchik, M. J. (2010). PD-1 regulates germinal center B cell

survival and the formation and affinity of long-lived plasma cells. *Nature Immunology*, 11(6), 535–542. <https://doi.org/10.1038/ni.1877>

Greaves, P., Clear, A. J., Owen, A., Wilson, A., Matthews, J., Calaminici, M., & Gribben, J. G. (2011). The PD1/PD-L1 Axis in the Classical Hodgkin Lymphoma Microenvironment: PD-1 Is Rarely Expressed but Identifies Patients with High-Risk Disease. *Blood*, 118(21), 1560. <https://doi.org/10.1182/blood.V118.21.1560.1560>

Greaves, P., Clear, A., Owen, A., Iqbal, S., Lee, A., Matthews, J., Wilson, A., Calaminici, M., & Gribben, J. G. (2013). Defining characteristics of classical Hodgkin lymphoma microenvironment T-helper cells. *Blood*, 122(16), 2856–2863. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-06-508044>

Green, M. R., Rodig, S., Juszczynski, P., Ouyang, J., Sinha, P., O'Donnell, E., Neuberg, D., & Shipp, M. A. (2012). Constitutive AP-1 activity and EBV infection induce PD-L1 in Hodgkin lymphomas and posttransplant lymphoproliferative disorders: implications for targeted therapy. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 18(6), 1611–1618. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-1942>

Greenough, T. C., Campellone, S. C., Brody, R., Jain, S., Sanchez-Merino, V., Somasundaran, M., & Luzuriaga, K. (2010). Programmed Death-1 expression on Epstein Barr virus specific CD8+ T cells varies by stage of infection, epitope specificity, and T-cell receptor usage. *PloS One*, 5(9), e12926. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012926>

Gru, A. A., Haverkos, B. H., Freud, A. G., Hastings, J., Nowacki, N. B., Barrionuevo, C., Vigil, C. E., Rochford, R., Natkunam, Y., Baiocchi, R. A., & Porcu, P. (2015). The Epstein-Barr Virus (EBV) in T Cell and NK Cell Lymphomas: Time for a Reassessment. *Current Hematologic Malignancy Reports*, 10(4), 456–467. <https://doi.org/10.1007/s11899-015-0292-z>

Gulley, M. L., Glaser, S. L., Craig, F. E., Borowitz, M., Mann, R. B., Shema, S. J., & Ambinder, R. F. (2002). Guidelines for interpreting EBER in situ hybridization and LMP1 immunohistochemical tests for detecting Epstein-Barr virus in Hodgkin lymphoma. *American Journal of Clinical Pathology*, 117(2), 259–267. <https://doi.org/10.1309/MMAU-0QYH-7BHA-W8C2>

Hollander, P., Amini, R.-M., Ginman, B., Molin, D., Enblad, G., & Glimelius, I. (2018). Expression of PD-1 and PD-L1 increase in consecutive biopsies in patients with classical Hodgkin lymphoma. *PloS One*, 13(9), e0204870. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204870>

- Hui, E. (2019). Immune checkpoint inhibitors. *The Journal of Cell Biology*, 218(3), 740–741. <https://doi.org/10.1083/jcb.201810035>
- INEN. (2018). *CASOS NUEVOS DE CÁNCER REGISTRADOS EN INEN, PERIODO 2009-2018*. <https://portal.inen.sld.pe/indicadores-anuales-de-gestion-produccion-hospitalaria/>
- Jalali, S., Price-Troska, T., Bothun, C., Villasboas, J., Kim, H.-J., Yang, Z.-Z., Novak, A. J., Dong, H., & Ansell, S. M. (2019). Reverse signaling via PD-L1 supports malignant cell growth and survival in classical Hodgkin lymphoma. *Blood Cancer Journal*, 9(3), 22. <https://doi.org/10.1038/s41408-019-0185-9>
- Juszczynski, P., Ouyang, J., Monti, S., Rodig, S. J., Takeyama, K., Abramson, J., Chen, W., Kutok, J. L., Rabinovich, G. A., & Shipp, M. A. (2007). The AP1-dependent secretion of galectin-1 by Reed Sternberg cells fosters immune privilege in classical Hodgkin lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(32), 13134–13139. <https://doi.org/10.1073/pnas.0706017104>
- Keir, M. E., Butte, M. J., Freeman, G. J., & Sharpe, A. H. (2008). PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annual Review of Immunology*, 26, 677–704. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.26.021607.090331>
- Kumar, V., Abbas, A. K., & Aster, J. (2021). Evasion of Immune Surveillance. In *Pathologic Basis of Disease* (pp. 309–313).
- Küppers, R. (2003). B cells under influence: transformation of B cells by Epstein-Barr virus. *Nature Reviews. Immunology*, 3(10), 801–812. <https://doi.org/10.1038/nri1201>
- Lantuejoul, S., Sound-Tsao, M., Cooper, W. A., Girard, N., Hirsch, F. R., Roden, A. C., Lopez-Rios, F., Jain, D., Chou, T.-Y., Motoi, N., Kerr, K. M., Yatabe, Y., Brambilla, E., Longshore, J., Papotti, M., Sholl, L. M., Thunnissen, E., Rekhtman, N., Borczuk, A., ... Mino-Kenudson, M. (2020). PD-L1 Testing for Lung Cancer in 2019: Perspective from the IASLC Pathology Committee. *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 15(4), 499–519. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2019.12.107>
- Lin, R. J., & Diefenbach, C. S. (2016). Checkpoint Inhibition in Hodgkin Lymphoma: Saving the Best for Last? *Oncology (Williston Park, N.Y.)*, 30(10), 914–920.

- Longnecker, R. M., Kieff, E., & Cohen, J. I. (2013). Epstein-barr virus. In *Fields Virology: Sixth Edition*. Wolters Kluwer Health Adis (ESP).
- Mathas, S., Hinz, M., Anagnostopoulos, I., Krappmann, D., Lietz, A., Jundt, F., Bommert, K., Mehta-Grigoriou, F., Stein, H., Dörken, B., & Scheidereit, C. (2002). Aberrantly expressed c-Jun and JunB are a hallmark of Hodgkin lymphoma cells, stimulate proliferation and synergize with NF-kappa B. *The EMBO Journal*, 21(15), 4104–4113. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf389>
- Merryman, R., & Reid, P. (2017). Hodgkin lymphoma and PD-1 blockade: an unfinished story. *Annals of Lymphoma*, 1(3), 1–14.
- Muenst, S., Hoeller, S., Dirnhofer, S., & Tzankov, A. (2009). Increased programmed death-1+ tumor-infiltrating lymphocytes in classical Hodgkin lymphoma substantiate reduced overall survival. *Human Pathology*, 40(12), 1715–1722. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2009.03.025>
- Nakatsuka, S., & Aozasa, K. (2006). Epidemiology and pathologic features of Hodgkin lymphoma. *International Journal of Hematology*, 83(5), 391-397. <https://doi.org/10.1532/IJH97.05184>
- Navarro, A., Diaz, T., Martinez, A., Gaya, A., Pons, A., Gel, B., Codony, C., Ferrer, G., Martinez, C., Montserrat, E., & Monzo, M. (2009). Regulation of JAK2 by miR-135a: prognostic impact in classic Hodgkin lymphoma. *Blood*, 114(14), 2945–2951. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-02-204842>
- Ng, A. K., Weiss, L. M., & LaCasce, A. S. (2016a). Chapter 76 - Hodgkin 's Lymphoma. In L. L. Gunderson & J. E. Tepper (Eds.), *Clinical Radiation Oncology (Fourth Edition)* (Fourth Edi, pp. 1506-1523.e5). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-323-24098-7.00076-9>
- Ng, A. K., Weiss, L. M., & LaCasce, A. S. (2016b). Chapter 76 - Hodgkin 's Lymphoma. In L. L. Gunderson & J. E. Tepper (Eds.), *Clinical Radiation Oncology (Fourth Edition)* (Fourth Edi, pp. 1506-1523.e5). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-323-24098-7.00076-9>
- Ouyang, J., Juszczynski, P., Rodig, S. J., Green, M. R., O'Donnell, E., Currie, T., Armant, M., Takeyama, K., Monti, S., Rabinovich, G. A., Ritz, J., Kutok, J. L., & Shipp, M. A. (2011). Viral induction and targeted inhibition of galectin-1 in EBV + posttransplant lymphoproliferative disorders. *Blood*, 117(16), 4315–4322. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-11-320481>

- Ozturk, V., Yikilmaz, A. S., Kilicarslan, A., Bakanay, S. M., Akinci, S., & Dilek, İ. (2020). The Triple Positivity for EBV, PD-1, and PD-L1 Identifies a Very High-Risk Classical Hodgkin Lymphoma. *Clinical Lymphoma, Myeloma & Leukemia*, 20(7), e375–e381. <https://doi.org/10.1016/j.clml.2019.11.021>
- Pardo Minda, J., Panizo, A., & Martínez, L. (1998). Valoración del sistema de polímeros de dextrano EnVision (PDE) en la detección inmunohistoquímica. *Revista Española de Patología*, 31(1), 9–16.
- Paydas, S., Bağır, E., Seydaoglu, G., Ercolak, V., & Ergin, M. (2015). Programmed death-1 (PD-1), programmed death-ligand 1 (PD-L1), and EBV-encoded RNA (EBER) expression in Hodgkin lymphoma. *Annals of Hematology*, 94(9), 1545–1552. <https://doi.org/10.1007/s00277-015-2403-2>
- Pilz, L. R., Manegold, C., & Schmid-Bindert, G. (2012). Statistical considerations and endpoints for clinical lung cancer studies: Can progression free survival (PFS) substitute overall survival (OS) as a valid endpoint in clinical trials for advanced non-small-cell lung cancer? *Translational Lung Cancer Research*, 1(1), 26–35. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2218-6751.2011.12.08>
- Poirel, H. A., Bernheim, A., Schneider, A., Meddeb, M., Choquet, S., Leblond, V., Charlotte, F., Davi, F., Canioni, D., Macintyre, E., Mamzer-Bruneel, M.-F., Hirsch, I., Hermine, O., Martin, A., Cornillet-Lefebvre, P., Patey, M., Toupance, O., Kémény, J.-L., Deteix, P., & Raphaël, M. (2005). Characteristic pattern of chromosomal imbalances in posttransplantation lymphoproliferative disorders: correlation with histopathological subcategories and EBV status. *Transplantation*, 80(2), 176–184. <https://doi.org/10.1097/01.tp.0000163288.98419.0d>
- Raab-Traub, N., & Flynn, K. (1986). The structure of the termini of the Epstein-Barr virus as a marker of clonal cellular proliferation. *Cell*, 47(6), 883–889. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(86\)90803-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(86)90803-2)
- Rathore, B., & Kadin, M. E. (2010). Hodgkin's lymphoma therapy: past, present, and future. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 11(17), 2891–2906. <https://doi.org/10.1517/14656566.2010.515979>
- Rickinson, A. V. (2007). Epstein-barr virus. *Fields Virology*, 2655–2700.
- Rinaldi, A., Kwee, I., Poretti, G., Mensah, A., Pruneri, G., Capello, D., Rossi, D., Zucca, E., Ponzoni, M., Catapano, C., Tibiletti, M. G., Paulli, M., Gaidano, G., & Bertoni, F. (2006). Comparative genome-wide profiling of

post-transplant lymphoproliferative disorders and diffuse large B-cell lymphomas. *British Journal of Haematology*, 134(1), 27–36. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2006.06114.x>

Rodig, S. J., Ouyang, J., Juszczynski, P., Currie, T., Law, K., Neuberger, D. S., Rabinovich, G. A., Shipp, M. A., & Kutok, J. L. (2008). AP1-dependent galectin-1 expression delineates classical Hodgkin and anaplastic large cell lymphomas from other lymphoid malignancies with shared molecular features. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 14(11), 3338–3344. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-4709>

Roemer, M. G. M., Advani, R. H., Ligon, A. H., Natkunam, Y., Redd, R. A., Homer, H., Connelly, C. F., Sun, H. H., Daadi, S. E., Freeman, G. J., Armand, P., Chapuy, B., de Jong, D., Hoppe, R. T., Neuberger, D. S., Rodig, S. J., & Shipp, M. A. (2016). PD-L1 and PD-L2 Genetic Alterations Define Classical Hodgkin Lymphoma and Predict Outcome. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 34(23), 2690–2697. <https://doi.org/10.1200/JCO.2016.66.4482>

Roughan, J. E., & Thorley-Lawson, D. A. (2009). The intersection of Epstein-Barr virus with the germinal center. *Journal of Virology*, 83(8), 3968–3976. <https://doi.org/10.1128/JVI.02609-08>

Sakakida, T., Ishikawa, T., Uchino, J., Tabuchi, Y., Komori, S., Asai, J., Arai, A., Tsunetsuka, H., Kosuga, T., Konishi, H., Hongo, F., Inoue, M., Hirano, S., Ukimura, O., Taguchi, T., Takayama, K., & Itoh, Y. (2020). Safety and tolerability of PD-1/PD-L1 inhibitors in elderly and frail patients with advanced malignancies. *Oncology Letters*, 20(4), 14. <https://doi.org/10.3892/ol.2020.11875>

Simon, R., Mirlacher, M., & Sauter, G. (2004). Tissue microarrays. *BioTechniques*, 36(1), 98–105. <https://doi.org/10.2144/04361RV01>

Song, Y., Gao, Q., Zhang, H., Fan, L., Zhou, J., Zou, D., Li, W., Yang, H., Liu, T., Wang, Q., Lv, F., Guo, H., Yang, L., Elstrom, R., Huang, J., Novotny, W., Wei, V., & Zhu, J. (2020). Treatment of relapsed or refractory classical Hodgkin lymphoma with the anti-PD-1, tislelizumab: results of a phase 2, single-arm, multicenter study. *Leukemia*, 34(2), 533–542. <https://doi.org/10.1038/s41375-019-0545-2>

Spranger, S., & Gajewski, T. F. (2018). Mechanisms of Tumor Cell–Intrinsic Immune Evasion. *Annual Review of Cancer Biology*, 2(1), 213–228. <https://doi.org/10.1146/annurev-cancerbio-030617-050606>

- Stahel, R., Bogaerts, J., Ciardiello, F., de Ruyscher, D., Dubsky, P., Ducreux, M., Finn, S., Laurent-Puig, P., Peters, S., Piccart, M., Smit, E., Sotiriou, C., Tejpar, S., Van Cutsem, E., & Tabernero, J. (2015). Optimising translational oncology in clinical practice: strategies to accelerate progress in drug development. *Cancer Treatment Reviews*, *41*(2), 129–135. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2014.12.004>
- Steidl, C., Telenius, A., Shah, S. P., Farinha, P., Barclay, L., Boyle, M., Connors, J. M., Horsman, D. E., & Gascoyne, R. D. (2010). Genome-wide copy number analysis of Hodgkin Reed-Sternberg cells identifies recurrent imbalances with correlations to treatment outcome. *Blood*, *116*(3), 418–427. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-12-257345>
- Stein, H; Pileri, S; Weiss, L. & al. (2017). Hodgkin lymphomas: Introduction. In J. Swerdlow, SH; Campo, E; Harris, NL; Jaffe, ES; Pileri, SA; Stein, H; Thiele (Ed.), *WHO Classification of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues* (Revised 4t, pp. 424–430). International Agency for Research on Cancer.
- Sun, L., Zhang, L., Yu, J., Zhang, Y., Pang, X., Ma, C., Shen, M., Ruan, S., Wasan, H. S., & Qiu, S. (2020). Clinical efficacy and safety of anti-PD-1/PD-L1 inhibitors for the treatment of advanced or metastatic cancer: a systematic review and meta-analysis. *Scientific Reports*, *10*(1), 2083. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58674-4>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *71*(3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Tempera, I., & Lieberman, P. M. (2014). Epigenetic regulation of EBV persistence and oncogenesis. *Seminars in Cancer Biology*, *26*, 22–29. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2014.01.003>
- Tomihara, K., Curiel, T. J., & Zhang, B. (2013). Optimization of immunotherapy in elderly cancer patients. *Critical Reviews in Oncogenesis*, *18*(6), 573–583. <https://doi.org/10.1615/critrevoncog.2013010591>
- Van Roosbroeck, K., Cox, L., Tousseyn, T., Lahortiga, I., Gielen, O., Cauwelier, B., De Paepe, P., Verhoef, G., Marynen, P., Vandenberghe, P., De Wolf-Peeters, C., Cools, J., & Wlodarska, I. (2011). JAK2 rearrangements, including the novel SEC31A-JAK2 fusion, are recurrent in classical Hodgkin lymphoma. *Blood*, *117*(15), 4056–4064. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-06-291310>

- Vargas-Rojas, M. I., Jimenez, L., Ramirez, G., Torres-García, D., Barquera, R., Gastelum-Martínez, A., & Zúñiga, J. (2008). PD-1 y sus ligandos como reguladores de la respuesta inmune. *Revista Del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*, 21(4), 272–279.
- Ventola, C. L. (2017). Cancer Immunotherapy, Part 1: Current Strategies and Agents. *P & T: A Peer-Reviewed Journal for Formulary Management*, 42(6), 375–383.
- Volaric, A., Bacchi, C. E., & Gru, A. A. (2020). PD-1 and PD-L1 Immunohistochemistry as a Diagnostic Tool for Classic Hodgkin Lymphoma in Small-volume Biopsies. *The American Journal of Surgical Pathology*, 44(10), 1353–1366. <https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000001524>
- Waldman, A. D., Fritz, J. M., & Lenardo, M. J. (2020). A guide to cancer immunotherapy: from T cell basic science to clinical practice. *Nature Reviews. Immunology*, 20(11), 651–668. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0306-5>
- Wang, H.-W., Balakrishna, J. P., Pittaluga, S., & Jaffe, E. S. (2019). Diagnosis of Hodgkin lymphoma in the modern era. *British Journal of Haematology*, 184(1), 45–59. <https://doi.org/10.1111/bjh.15614>
- Weng, N.-P., Akbar, A. N., & Goronzy, J. (2009). CD28(-) T cells: their role in the age-associated decline of immune function. *Trends in Immunology*, 30(7), 306–312. <https://doi.org/10.1016/j.it.2009.03.013>
- Weniger, M. A., Melzner, I., Menz, C. K., Wegener, S., Bucur, A. J., Dorsch, K., Mattfeldt, T., Barth, T. F. E., & Möller, P. (2006). Mutations of the tumor suppressor gene SOCS-1 in classical Hodgkin lymphoma are frequent and associated with nuclear phospho-STAT5 accumulation. *Oncogene*, 25(18), 2679-2684. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209151>
- Xu-Monette, Z. Y., Zhou, J., & Young, K. H. (2018). PD-1 expression and clinical PD-1 blockade in B-cell lymphomas. *Blood*, 131(1), 68–83. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-07-740993>
- Yamamoto, R., Nishikori, M., Kitawaki, T., Sakai, T., Hishizawa, M., Tashima, M., Kondo, T., Ohmori, K., Kurata, M., Hayashi, T., & Uchiyama, T. (2008). PD-1-PD-1 ligand interaction contributes to immunosuppressive microenvironment of Hodgkin lymphoma. *Blood*, 111(6), 3220–3224. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-05-085159>

Younes, A., Santoro, A., Shipp, M., Zinzani, P. L., Timmerman, J. M., Ansell, S., Armand, P., Fanale, M., Ratanatharathorn, V., Kuruvilla, J., Cohen, J. B., Collins, G., Savage, K. J., Trneny, M., Kato, K., Farsaci, B., Parker, S. M., Rodig, S., Roemer, M. G. M., ... Engert, A. (2016). Nivolumab for classical Hodgkin's lymphoma after failure of both autologous stem-cell transplantation and brentuximab vedotin: a multicentre, multicohort, single-arm phase 2 trial. *The Lancet. Oncology*, *17*(9), 1283–1294. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(16\)30167-X](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(16)30167-X)

Zafra Sierra, G., Flórez Vargas, O., & Gónzals Rugeles, C. (2004). Influencia del método de desparafinación y el tiempo de almacenamiento en la extracción de DNA a partir de tejidos de archivo. *Rev. Univ. Ind. Santander, Salud*, *36*(2), 73–79.

Zak, K. M., Grudnik, P., Magiera, K., Dömling, A., Dubin, G., & Holak, T. A. (2017). Structural Biology of the Immune Checkpoint Receptor PD-1 and Its Ligands PD-L1/PD-L2. *Structure (London, England: 1993)*, *25*(8), 1163–1174. <https://doi.org/10.1016/j.str.2017.06.011>

ANEXOS

Anexo 1. Ficha de recolección de datos

AP	TVA	Razón	Edad	Sexo	Localización	EC	QT	Ingreso	Ultimo tratamiento	PV	VE	VE	S	Lib	FD-1	FD-2	FD-3	FD-4	FD-5	FD-6	FD-7	FD-8	FD-9	FD-10	
	TV4L	4	##	14	F	Cervical, mediatral, intracubital	III	S	19/04/2015	30/11/2015				CVI	1									POSITIVO	
	TV4L	5	##	51	F	Axilar, pleural, hipo, hueso, partes blandas	IV	S	29/01/2015	18/07/2015	Nb	S		EN	1				NEGATIVO					POSITIVO	
	TV4L	6	##	40	M	Cervicales, mediatral, retroperitoneal, hipo, bazo	IV	Nb	22/02/2015	09/04/2015				CVI	1				NEGATIVO					POSITIVO	
	TV4L	7	##	25	F	Cervical	II	S	18/08/2015	24/05/2017	S	S		EN	1									POSITIVA	
	TV4L	8	##	45	F	Axilar, cervical, intracubital (Bazo)	III	S	27/09/2015	27/07/2018	S	S		CVI	1				NEGATIVA					POSITIVO	
	TV4L	9	##	35	M	Axilar, mediatral	II	Nb	09/10/2015	11/10/2015					1				NEGATIVA					NEGATIVO	
	TV4L	11	##	35	M	Cervical, axilar, mediatral, retroperitoneal, hueso	IV	S	09/09/2015	18/02/2016	S	S		EN	1				NEGATIVA					NEGATIVO	
	TV4L	12	##	13	M	Mediatral, retroperitoneo	III	S	11/02/2015	06/01/2017	S	S		CVI	1				NEGATIVA					POSITIVO	
	TV4L	13	##	22	M	Cervicales, axilares, mediatral	II	S	14/10/2015	25/02/2017				EN	1									POSITIVA	
	TV4L	14	##	02	F	Cervicales, axilares, hueso	IV	S	18/08/2015	27/10/2017	Nb	S		EN	NE				NEGATIVO					NEGATIVO	
	TV4L	15	##	33	M	Cervicales, axilares	II		31/10/2015	18/11/2015	S	S			1				NEGATIVA					NEGATIVO	
	TV4L	4	##	10	M	Cervical, mediatral, retroperitoneal, inguinal, hueso	IV S+TH		05/08/2015	09/09/2015	Nb	S		EN	NE									POSITIVA	
	TV4L	5	##	27	M	Cervical, axilar, mediatral, inguinal, retroperitoneal, bazo	III	S	10/02/2015	11/04/2017	S	S		EN	1									POSITIVA	
	TV4L	6	##	64	M	Cervical, bilateral	II	S	23/08/2016	05/07/2018				CVI	1									POSITIVA	
	TV4L	7	##	25	M	Axilar, retroperitoneal, inguinal, mediatral	III	S	18/10/2016	10/07/2017	S	S			1				NEGATIVA					POSITIVO	
	TV4L	8	##	81	M	Cervical, mediatral, intracubital	III	Nb	09/06/2016	29/11/2016	S			CVI	1				NEGATIVA					POSITIVO	
	TV4L	9	##	40	F	Axilar, mediatral	II	S	2/06/2016	23/02/2017	S	S		EN	1				NEGATIVA					NEGATIVO	
	TV4L	10	##	23	M	Cervical, axilares	II	S+TH	10/09/2015	28/05/2017	S	S		EN	1				NEGATIVA					POSITIVO	
	TV4L	11	##	25	F	Cervical, mediatral, retroperitoneal	III	CH+TH	15/02/2015	27/10/2017	Nb	S		EN	1									POSITIVA	
	TV4L	12	##	5	M	Cervical, obtario, mediatral, retroperitoneal, axilar, óseo	IV	S	25/09/2017	15/09/2018	S	S		CVI	1									POSITIVA	
	TV4L	13	##	5	M	Cervical, obtario, mediatral, retroperitoneal, axilar, óseo	IV	S	25/09/2017	15/09/2018	S	S		CVI	1									POSITIVA	
	TV4B	4	##	24	M	Cervical, bilateral, Axilar, Retroperitoneal, Mediatral	II	S	11/04/2015	29/07/2017				EN	1									POSITIVO	
	TV4B	5	##	64	M	Cervical, axilar, retroperitoneal, bazo	III	S	14/06/2016	30/11/2018	S	S		EN									X	NEGATIVO	
	TV4B	6	##	15	M	Cervical	I		24/07/2016		S			CVI	1										NEGATIVO
	TV4B	7	##	19	M	Cervical, bilateral, retroperitoneal	III	S+TH	14/08/2016	24/11/2017	Nb	S			1				NEGATIVO					NEGATIVO	
	TV4B	8	##	29	M	Cervical, bilateral, mediatral	II	Nb	16/10/2016	27/10/2018	S	S			1				NEGATIVO						NEGATIVO
	TV4B	9	##	54	F	Cervical, bilateral, Axilar, Retroperitoneal, Mediatral	III	S	19/10/2016	09/10/2017	Nb	S		EN	1				NEGATIVO					POSITIVO	
	TV4B	10	##	29	F	Cervical, Axilar, Mediatral, intracubital	III	S	04/01/2018	25/02/2017	Nb			RL	1				NEGATIVO					POSITIVO	
	TV4B	11	##	4	M	Cervical, bilateral, Mediatral, Retroperitoneal	III	S	27/11/2016	19/11/2017	Nb	S		CVI	1				NEGATIVO					POSITIVO	
	TV4B	12	##	71	F	Cervical, Mediatral, Retroperitoneal, Bazo, Oofaringeo	III	Nb	17/12/2016	25/01/2019	Nb				1				NEGATIVO					POSITIVO	
	TV4B	13	##	6	M	Cervical, Mediatral	II	Nb	09/01/2019	15/01/2019	S	S		EN	1				NEGATIVO					POSITIVO	
	TV4B	14	##	32	M	Cervical, mediatral, retroperitoneal, hipo	IV	S+TH	27/11/2018	09/11/2017	Nb	S		EN	1				NEGATIVO					NEGATIVO	
	TV4B	15	##	7	F	Cervical, axilares, mediatrales, retroperitoneales	III	S	15/02/2019	18/10/2017	Nb	S		EN					NEGATIVO				X	NEGATIVO	
	TV4A	4	##	41	M	Cervicales, axilares, mediatrales, retroperitoneales, Nb	IV	S	23/02/2015	08/09/2017	S	S			1				NEGATIVO					POSITIVO	
	TV4A	6	##	22	F	Axilar, mediatral, retroperitoneal	III		23/07/2016	22/11/2017	Nb	S			1				NEGATIVO					NEGATIVO	
	TV4A	7	##	6	F	Cervical, axilar, mediatral	II	S	10/04/2016	23/10/2017	Nb	S		EN	1				NEGATIVO					POSITIVO	
	TV4A	8	##	19	F	Cervicales, axilares, mediatrales, retroperitoneales, hipo	IV	S	08/04/2016	15/10/2017	Nb	S			1				NEGATIVO					NEGATIVO	
	TV4A	9	##	23	M	Cervicales, Mediatrales	II		25/12/2016	19/11/2017	Nb	S		EN	1									POSITIVO	

Anexo 2. Anticuerpos para inmunohistoquímica y sonda para CISH-EBER

Anticuerpo/Sonda	Marca / Clona	Dilución	Método automatizado	Recuperación antigénica
PD-L1	Vitro Master Diagnóstica / CAL10	Listo para usar	Polímeros. Equipo Autostainer Link 48 (Agilent Dako)	Tris EDTA, 20 minutos
PD-1	Vitro Master Diagnóstica / NAT 105	Listo para usar	Polímeros. Equipo Autostainer Link 48 (Agilent Dako)	Tris EDTA, 20 minutos
Histo sonda EBER	Vitro Master Diagnóstica /	Listo para usar	CISH (Hibridación in Situ cromogénica) /Polímeros. Equipo Autostainer Link 48 (Agilent Dako)	No aplica

Anexo 3. Aprobación por el comité de investigación del INEN



PERÚ

Sector
Salud

Instituto Nacional de
Enfermedades Neoplásicas



"DECENIO DE LA IGUALDAD DE OPORTUNIDADES PARA MUJERES Y HOMBRES"
"AÑO DE LA UNIDAD, LA PAZ Y EL DESARROLLO"

CONSTANCIA

Quien suscribe, extiende la presente constancia a:

María del Rosario Villa Robles

En la posición de Investigador en el proyecto:


**"EXPRESIÓN DE PROTEÍNA DE MUERTE PROGRAMADA 1, SU LIGANDO, Y DEL
RNA DEL VIRUS EPSTEIN-BARR, EN LINFOMA DE HODKIN RELACIONADA AL
PRÓNOSTICO DE VIDA EN PACIENTES PERUANOS 2015 - 2018"**

Aprobado por el Comité Revisor de Protocolos de Investigación con el código **INEN 21-34**.
Este proyecto se ejecuta en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas desde Julio
2021.

Sin otro particular, quedo de Ud.

Atentamente,

Lima, 11 de enero de 2023


Dra. Ofelia Coanqui Gonzales
Oncología Médica
CMP. 44116 PNE. 27602
M.C. Ofelia Coanqui Gonzáles
Presidenta
Comité Revisor de Protocolos
de Investigación

Cc/Archivo
lc.



Av. Angamos Este
2520 - Surquillo
Telf.: 201-6500
www.inen.gob.pe
Lima - Perú