

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

CENTRO MEDICO NACIONAL LA RAZA

HOSPITAL DE ESPECIALIDADES

DEPARTAMENTO DE MEDICINA INTERNA

Evaluación de marcadores de superficie CD10 e intracelulares BCL2 y Ki67, como factores pronóstico de respuesta temprana a la quimioterapia en pacientes con Linfoma No Hodgkin de Células B Grandes.

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE ESPECIALISTA EN MEDICINA INTERNA

PRESENTA: DAVID RICARDO VILLALBA CAMACHO.

Asesor DR. MOISES CASARRUBIAS RAMÍREZ.

DRA. ELSA VERÓNICA ÁVILA ARREGUÍN.

México D.F.

2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AUTORIZACION DE TESIS

DR. JESUS ARENAS OSUNA

DIVISION DE EDUCACION EN SALUD

DRA. OLGA LIDIA VERA LASTRA

TITULAR DEL CURSO UNIVERSITARIO EN MEDICINA INTERNA

DR. DAVID RICARDO VILLALBA CAMACHO

ALUMNO

No. Protocolo. R – 2009 – 3501 – 74.

Dedico esta Tesis a mi esposa Elsa, por su invaluable y amoroso apoyo incondicional, gracias por inspirarme. A mi hija, quien me acompañó durante toda la obra. A mi madre por su orientación y apoyo. A mis hermanas Carla y Andrea por su complicidad y compañía. A mi abuela Guadalupe, quien estaría feliz de ver concluída esta etapa de mi vida. A mi mentor el Dr. Moisés Casarrubias por su clara visión y sabios consejos, por su dedicación a la enseñanza de mi generación.

CONTENIDO

1. Título.	Pág. 1
2. Resumen	Pág. 4
3. Objetivo.	Pág. 8
4. Introducción.	Pág. 9
5. Pacientes y método.	Pág. 21
6. Resultados.	Pág. 26
7. Discusión.	Pág. 40
8. Conclusiones.	Pág. 46
9. Palabras clave.	Pág. 47
10. Referencia Bibliográficas.	Pág. 48
11. Índice de Tablas y Figuras.	Pág. 52

2. RESUMEN.

Introducción: Los Linfomas No Hodgkin difusos de células B grandes (LNHCGB) son un grupo heterogéneo de neoplasias linfoides en donde sus características clínicas, morfológicas y genéticas le confieren un factor pronóstico.

Objetivo: Evaluar los marcadores de superficie e intracelulares CD10, Bcl2 y Ki67 como factores pronóstico en pacientes con Linfoma No Hodgkin de células B Grandes.

Pacientes y Método: Se incluyeron 84 paciente del Hospital de Especialidades del Centro Médico "La Raza" IMSS, que ingresaron durante el año de 2008, con diagnóstico de LNHCGB, a los cuales se les evaluaron sus características clínicas, estudios histopatológico en biopsia de ganglio o sitio afectado, clasificación en grupos de riesgo de acuerdo al índice pronostico internacional (IPI). A partir de las biopsias una vez confirmadas como linfoma de células B, se determinó la expresión de los marcadores CD10, Bcl2 y Ki67 en cortes representativos por medio técnica de inmunohistoquímica. Los resultados obtenidos se analizaron utilizando la prueba de X^2 , y cálculo de riesgos relativos asociados a la respuesta clínica temprana a la quimioterapia.

Resultados: la edad media fue 58.6 años (16.6 dvst.), 52% hombres. Se observó una edad de más de 60 años en 51.2%, DHL elevada en 39.3%, estadio clínico avanzado en 58.4%, escala ECOG avanzada en 7.2%, presencia de síntomas B en 64.3%. Se observó la presencia de CD10 en 39.3%, Bcl2 75% y Ki67 en 38.1%. No se observó una mayor respuesta a la quimioterapia en presencia de CD10+ (RR 0.52, IC 95%, 0.14 – 1.88; p = 0.341). No se observó una tasa mayor de falla de la respuesta a la quimioterapia en presencia de Bcl2 (RR 0.93, IC 95%, 0.30 – 2.83; p = 1.000), no se observó una tasa mayor de falla a la quimioterapia en presencia de Ki67+ (RR 0.78, IC 95%, 0.29 – 2.10; p = 0.803).

Conclusiones: Los marcadores de superficie CD10 e intracelulares Bcl2 y Ki67 no son capaces de predecir ningún tipo de respuesta temprana a la quimioterapia. El IPI sigue siendo una herramienta clínica pronóstica de utilidad en la predicción de respuesta al tratamiento y su traducción en sobrevida.

ABSTRACT.

Introduction: The diffuse large B cell Non Hodgkin lymphomas are a heterogeneous group of lymphoid neoplasias with their clinical, morphological and genetic characteristics means a clinical prognosis.

Objective: To evaluate cellular markers CD10, Bcl2 and Ki-67 like prognostic indicators in patients with DLBCNHL (Diffuse large B cell Non – Hodgkin lymphoma).

Patients and method: 84 patients with new diagnosis of DLBCNHL during 2008 were included in our study, each of them were previously evaluated clinically and morphologically in biopsy of the affected site. IPI risk were measured (LDH levels, Ann Arbor classification by CT, age at diagnosis). CD10, Bcl2 and Ki67 were measured in biopsy by immunochemistry in representative samples. The results were analyzed with χ^2 and RR test to associate de early response to chemotherapy.

Results: we find a median age of 58.6 years old, 52% were men, 51% were older than 60 y/o, a high LDH in 39.3%, high Ann Arbor in 58.4%, high ECOG in 7.2% and B symptoms in 64.3%. We can not find a better response to chemotherapy in presence of CD10 (RR 0.52, CI 95%, 0.14 – 1.88; p=0.341), or Bcl2 (RR 0.93, CI 95%, 0.30 – 2.83; p=1.000) or Ki67 (RR 0.78, CI 95%, 0.29 –2.10; p=0.803).

Conclusion: the clinical characteristics of the patients at diagnosis (IPI) and the initial response to treatment may define the OS and DFS. In the present study we do not observed any prognostic value of the molecular markers studied.

3. OBJETIVO.

Evaluar los marcadores de superficie CD10 e intracelulares BCL2 y Ki67 como factores pronóstico de respuesta temprana a la quimioterapia en pacientes con Linfoma no Hodgkin de células B Grandes.

3. INTRODUCCIÓN.

Los linfomas conforman un grupo heterogéneo de enfermedades neoplásicas que comparten la característica única de surgir como resultado de mutaciones somáticas de un progenitor linfoide.⁽¹⁾ El sitio anatómico primario puede ser cualquiera, ya sea linfoide o no y puede involucrar cualquier otro órgano por efecto de diseminación. La clasificación de los subtipos de la enfermedad ha sido difícil, pero los nuevos sistemas de clasificación que incorporan las características inmunofenóticas con las histopatológicas y citológicas, describen subtipos definidos con mayor precisión que en el pasado.⁽²⁾

La diferenciación más temprana entre las neoplasias linfoides consistió en la distinción entre el linfoma de Hodgkin y las formas No Hodgkinianas.⁽²⁾ El linfoma de Hodgkin consiste en dos entidades clinicopatológicas, la forma clásica (4 subtipos) y la forma nodular con predominio de linfocitos y su célula neoplásica es la célula de Reed Sternberg, estas células han perdido la mayoría de sus marcadores del linaje B, incluyendo la expresión de inmunoglobulinas; casi todas son CD30+, la gran mayoría son CD15+; típicamente CD45- y CD20+ en 20 al 40%. ⁽¹⁾

Por otra parte, los linfomas No Hodgkinianos consisten en un grupo heterogéneo de enfermedades neoplásicas que comparten la característica única de surgir como resultado de mutaciones somáticas de un progenitor linfoide clasificable como B, T o

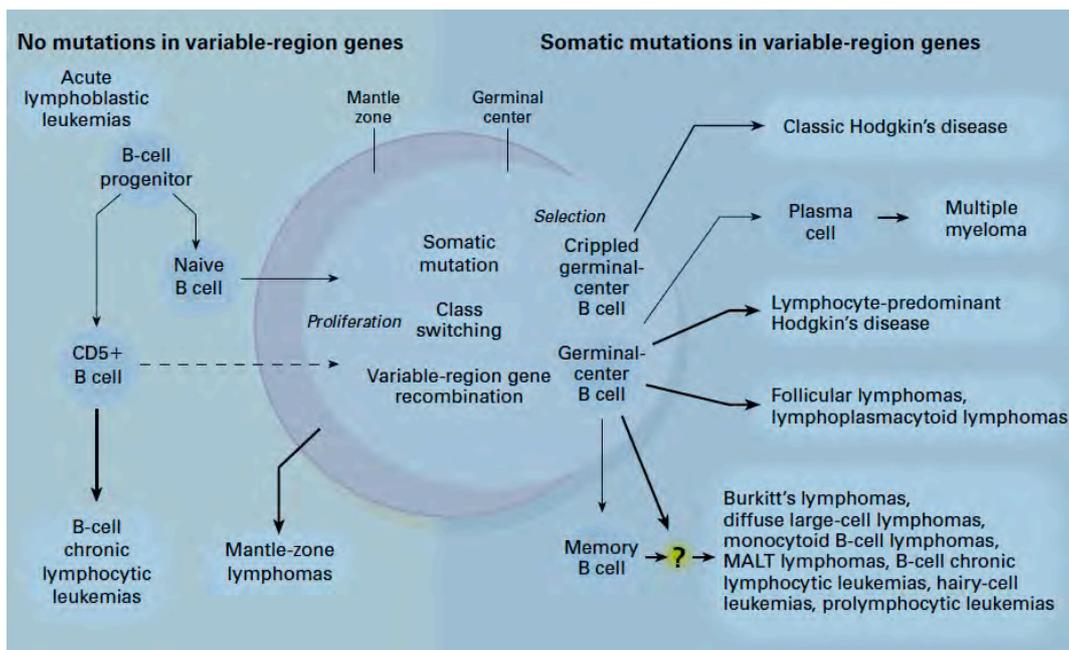
NK según los estudios de inmunofenotipo o de rearrreglo genético.⁽¹⁾ Para 1990, con la finalidad de eliminar la confusión persistente en los sistemas de clasificación de los linfomas se introdujo una nueva clasificación por parte del International Lymphoma Study Group, reuniendo la información disponible, tanto morfológica, inmunofenotípica, genética y clínica, se crea una lista de entidades distintivas que podrían ser uniformemente empleadas para el diagnóstico hematopatológico, creándose así la clasificación Revised European – American Lymphoma (REAL), publicándose dicha propuesta en el año de 1994.⁽²⁾ En la década de los 90, la OMS crea una nueva clasificación basada en la REAL, la cual identifica 3 categorías mayores de linfomas: neoplasias derivadas de células B, derivadas de células T o NK, cada una de estas dividida en neoplasias derivadas de precursores y neoplasias derivadas de células periféricas (maduras), y por otra parte el Linfoma de Hodgkin.⁽²⁾

El linfoma difuso de células B grandes (LDCBG) es el subtipo histopatológico de linfoma No Hodgkin más frecuente en México y en el resto del mundo; representa hasta el 30% de todos los linfomas No Hodgkin. Su incidencia ha ido en aumento a partir de la segunda mitad del siglo XX, siguiendo de manera paralela el proceso de industrialización de las naciones.⁽²⁾

El linfoma difuso de células B grandes es una enfermedad con heterogeneidad molecular resultado de múltiples mutaciones genéticas y translocaciones cromosómicas; esta enfermedad deriva de células B en las que ha iniciado el proceso de hipermutación somática en los genes de las regiones variables de las inmunoglobulinas, proceso que ocurre en el centro germinal del nodo linfático.⁽²⁾(Fig. 1)

(Fig. 2)(3)

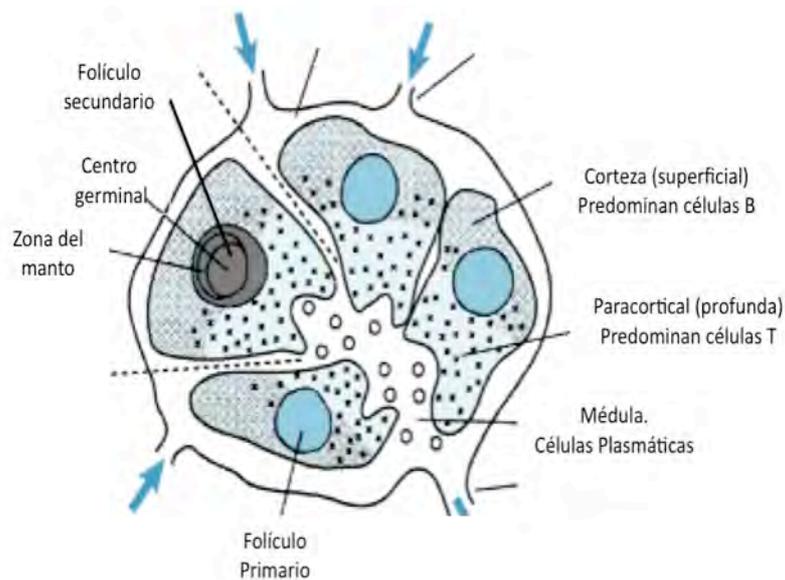
Figura 1. Desarrollo de los linfocitos normales y neoplásicos.



Los rearrreglos del gen BCL6 se consideran específicos del linfoma difuso de células B grandes. La proteína Bcl6 es la mediadora de la unión específica entre varios factores de transcripción del ADN y se involucra en el proceso de inducción de formación de los centros germinales de células B. La heterogeneidad de los LDCBG

es resultado evidente del perfil de expresión genética, de donde al menos se reconocen 3 subtipos, el más común, que se presenta en el 40% de los casos se asocia a rearrreglos del BCL6.⁽¹⁾

Figura 2. Estructura anatómica de los ganglios linfáticos.



Factores Pronósticos de los LNH.

La emisión del pronóstico, es decir, la predicción de la duración, curso y resultado de una enfermedad en un paciente determinado, es una parte esencial de la práctica médica.

Todo esfuerzo para la determinación de factores pronósticos tiene sólo dos intenciones primarias, la primera es proveer una predicción más precisa acerca de la posibilidad de supervivencia permitiendo una expectativa realista, una mejor decisión terapéutica en conjunto con el paciente, prescribir una terapia inicial más

adecuada y asegurar la estratificación objetiva para el reporte de resultados en los ensayos clínicos realizados. La segunda es identificar el subgrupo con características biológicas únicas que permita la identificación de objetivos terapéuticos que puedan ser útiles para el diseño de una terapia personalizada. (4)

Tipos de factores pronósticos. Podemos dividir los factores pronóstico de los linfomas No Hodgkin en tres grandes grupos:

1. Dependientes de las características del tumor.

- a. Las características biológicas del mismo: subtipo histológico, inmunofenotipo, alteraciones citogenéticas; actividad proliferativa, progresión histológica, la capacidad de progresión tumoral y de modo indirecto, nivel de DHL y presencia de síntomas B.
- b. La carga tumoral (la *cantidad* de LNH): extensión de la enfermedad y su estadio; presencia de masas abultadas (*bulky*); número de localizaciones afectadas (ganglionares y extraganglionares); localizaciones especiales (médula ósea, sistema nervioso central); y de modo indirecto, nivel de DHL, ácido úrico y presencia de síntomas B.

- 2. Extensión de la Enfermedad:** aunque se considera como el estándar de oro para la estadificación anatómica de la extensión de la enfermedad, la

clasificación de Ann Arbor no es la óptima para la clasificación del linfoma, aún así, ha demostrado importancia pronóstica en el caso de los LNH al momento del diagnóstico. Esta herramienta fue creada inicialmente para la estadificación del linfoma de Hodgkin, el cual se disemina por contigüidad más que de manera hematógena que es el caso del linfoma No Hodgkin.⁽⁵⁾ Por tal motivo la detección de pacientes en estadios tempranos de la enfermedad permite la oportunidad de terapia combinada potencialmente curativa. La clasificación de Ann Arbor provee información topográfica, pero no toma en cuenta la “carga tumoral” de la enfermedad.⁽⁵⁾(Tabla 1)

Tabla 1. Clasificación de Estadios de Ann Arbor.⁽¹⁾

Estadio I:

Involucro de una región ganglionar (I) o de única localización extralinfática (I-E)

Estadio II:

Involucro de 2 o más regiones ganglionares en el mismo lado del diafragma (II) o involucro de un sitio extralinfático y de una o más regiones ganglionares en el mismo lado del diafragma (II-E).

Estadio III:

Involucro de regiones linfáticas en ambos lados del diafragma (III), que pueden estar acompañadas por afección extralinfática localizada (III-E), esplénica (III-S) o de ambas (III-ES).

Estadio IV:

Involucro diseminado a uno o más órganos extralinfáticos, asociado o no a enfermedad en los ganglios linfáticos.

Síntomas:

A → Asintomático.

B → Fiebre, sudoración nocturna, pérdida ponderal significativa (>10%) en los 6 meses anteriores.

3. **Características dependientes del Paciente:** no es posible separar por completo aquellos factores que son dependientes del paciente de aquellos que son generados indirectamente por el tumor. Tal es el caso de la edad (la incidencia de los LNH muestra variaciones con la edad), el estado general medido según la escala OMS/ECOG, la competencia inmunológica del paciente o sus antecedentes patológicos. (Tabla 2)(3)

Tabla 2. Escala de Desempeño ECOG*/OMS/Zubrod

0 → Asintomático.

1 → Sintomático, completamente ambulatorio.

2 → Sintomático, <50% tiempo diurno en cama, ambulatorio, capaz de autocuidado.

3 → Sintomático, >50% tiempo diurno en cama, capaz de autocuidado básico.

4 → Sintomático, postrado en cama, incapaz de autocuidado.

5 → Muerto.

* ECOG (*Eastern Cooperative Oncology Group performance status*)

Oken *et al.*, 1982.⁽⁶⁾

Indices Pronósticos.

La gran heterogeneidad que presentan los linfomas No Hodgkin ha hecho difícil la elaboración de un sistema de estadificación útil, internacionalmente aceptado y validado para los LNH. El objetivo de todo índice pronóstico es el de conjuntar a los pacientes en grupos con factores de riesgo similares y crear un modelo predictivo por medio del cual sea posible inferir el riesgo relativo de un paciente en particular, a partir de un número limitado de variables presentes en el momento de realizar el diagnóstico.

El índice pronóstico mas utilizado es el denominado Indice Pronóstico Internacional.⁽⁵⁾ En dicho estudio, los factores asociados con la supervivencia que demostraron un mayor significado pronóstico independiente fueron son mostrados en la Tablas 3 y 4.

Actualmente se vive una era en la que el diagnóstico y pronóstico de la enfermedad se basa en la detección de una serie de factores de tipo molecular que aparentemente tienen una repercusión más clara y precisa en la supervivencia libre de enfermedad y en la supervivencia global, es decir, en la predicción del comportamiento biológico de la enfermedad. ⁽⁴⁾⁽⁷⁾⁽⁸⁾

Tabla 3. Índice Pronóstico Internacional*.⁽⁹⁾

Variables:	Edad (60 años o menos contra >60 años)
	Estadio Ann Arbor (I - II contra III - IV)
	Número de áreas extraganglionares afectadas (0 a 1 contra >1).
	Estado General (PS** 0 a 1 contra >1)
	DHL (normal contra anormal)

Se asigna una puntuación de 0 a 1 a cada variable descrita, se definen 4 grupos de riesgo:

- 0 - 1 Puntos → Bajo riesgo (90% 5 años libres de progresión)
- 2 Puntos → Riesgo intermedio bajo (80% 5 años libres de progresión)
- 3 Puntos → Riesgo intermedio alto (50% 5 años libres de progresión)
- 4 - 5 Puntos → Riesgo alto (50% 5 años libres de progresión)

Era Pre Rituximab: >1 factores de riesgo → <50% 5 años libres de progresión.

* The International NHL Prognostic Factors Project. General IPI.

** ECOG Performance Status

Tabla 4. IPI Ajustado a la edad (Pacientes mayores de 60 años) IPIae.⁽⁹⁾

Variables:	Estadio Ann Arbor (I - II contra III- IV)
	Estado General (PS* 0 - 1 contra >1)
	DHL (normal contra anormal)

Se asigna una puntuación de 0 a 1 a cada variable descrita, se definen 4 grupos de riesgo:

- 0 → Bajo riesgo
- 1 → Riesgo intermedio bajo
- 2 → Riesgo intermedio alto
- 3 → Riesgo alto

* ECOG Performance Status

Factores pronóstico independientes al IPI.

El estudio GELA concluyó que un incremento de la β 2-microglobulina (>3 mg/L) y el involucro de más de un sitio extranodal se asocia a un mal pronóstico en término de la sobrevida global. Por otra parte, el estudio MInT determina que la enfermedad voluminosa y la detección de al menos un factor de riesgo del IPIae, pueden predecir la sobrevida libre de enfermedad a 3 años (89% contra 76%, $P = 0.016$), pero sin comprobar cambios en la sobrevida global a 3 años (98% contra 91%, $P = 0.08$). A la fecha, ninguno de los estudios clínicos realizados ha podido distinguir al grupo de pacientes con suficiente mal pronóstico al momento del diagnóstico de su enfermedad, por lo que aún no es posible estratificar el tipo de tratamiento que debe recibir. En múltiples estudios clínicos se ha demostrado que existen otras características que asociadas al IPI se traducen en factores pronósticos.⁽⁴⁾

Marcadores moleculares pronósticos en los LDCBG.

La heterogeneidad de los LDCBG es notable por la expresión de una muy amplia variedad de aberraciones moleculares, algunas de las cuales han demostrado asociación con el pronóstico clínico. El estudio de estos biomarcadores han mejorado la comprensión de la patogenia de los linfomas y sus variedades; desafortunadamente tal variedad ha resultado en resultados controvertidos. ⁽⁴⁾

CD10. Es una endopeptidasa neutral asociada a la membrana que se reporta como marcador de superficie celular representativo de células B centro germinales y se expresa típicamente en linfomas foliculares de células B, que es la forma prevalente de los linfomas de células B de bajo grado. Es muy común en leucemia aguda linfoblástica. CD10 aparece en las células pre-B y se pierde durante la maduración de las células B vírgenes y reaparece en la superficie celular durante su maduración en el centro germinal. Se expresa en un 20 a 30% de los LDCGB. El comportamiento clínico de los tumores derivados de células B centrogerminales, con expresión atípica CD10-MUM1+ ha demostrado mayor edad del paciente al momento de la enfermedad clínica, morfología de mayor grado de malignidad, proliferación difusa con múltiples sitios de afectación, carencia de translocaciones BCL2/IgH y con anomalías en el gen BCL6.⁽¹⁰⁾ Por el contrario, el comportamiento clínico favorable es atribuible a la presencia del CD10 como parte importante de la cadena de señales de la vía de las caspasas, inductoras de apoptosis *in vivo* e *in vitro*, como demuestra Cutrona y cols.⁽¹¹⁾

BCL2. Es una proteína antiapoptótica que es importante en el desarrollo normal de las células B y su diferenciación. La sobreexpresión de Bcl2 se ha reportado en aproximadamente el 40-60% de los pacientes con LDCBG, se ha asociado con una pobre supervivencia. Las mutaciones por translocación t(14;18) del gen BCL2 se

observan con mayor frecuencia en los linfomas foliculares; estas mutaciones resultan en activación constitutiva e incremento de expresión de BCL2, asociadas a inhibición de apoptosis así como del bloqueo de la inducción de muerte celular inducida por quimioterapia.⁽¹²⁾ Esta asociación pronóstica es independiente del IPI.⁽¹³⁾

Ki67. Es un anticuerpo monoclonal marcador de una proteína nuclear presente en células en proliferación, su presencia se traduce como la fracción de crecimiento de los tumores, la determinación cuantitativa de dicho marcador se asocia a la tasa de crecimiento y se promueve como indicador relacionado con la sobrevida, siendo un factor independiente del IPI.⁽¹⁴⁾

Se han estudiado otros marcadores moleculares tanto de superficie como el CD21⁽¹⁵⁾⁽¹⁶⁾ e intracelulares como BCL6, FOX-P1 y MUM1⁽¹²⁾⁽¹⁷⁾⁽¹⁸⁾⁽⁷⁾, por su probable valor como factores pronósticos independientes al IPI. Hasta el momento se desconoce cual es el impacto pronóstico de otros marcadores de superficie, independiente del IPI y otros factores pronósticos.

5. PACIENTES Y MÉTODO.

Se incluyeron pacientes adultos mayores de 16 años con diagnóstico de LNH de células B grandes, vírgenes a quimioterapia y en quienes se realizaron estudios de marcadores moleculares por inmunohistoquímica, atendidos del 1ro de junio al 27 de noviembre de 2009 en el departamento de Hematología del Hospital de Especialidades del Centro Médico La Raza del Instituto Mexicano del Seguro Social, que es un hospital universitario de tercer nivel de atención.

Durante el periodo de junio a noviembre de 2009 se diagnosticaron 99 casos de Linfoma no Hodgkin de células B grandes a través de la consulta externa y hospitalización del departamento de Hematología y 11 casos se captaron a través del servicio de Patología Humana, división de Hematopatología. Una vez firmado el consentimiento informado, a cada uno de los pacientes se les realizó historia clínica, química de 27 elementos que incluye DHL; TC simple y contrastada de cuello, tórax, abdomen y pelvis, aplicación de escala de ECOG y según esos resultados se aplica la estadificación clínica de Ann Arbor y el índice pronóstico internacional IPI para la predicción de sobrevida. (Tabla 3)

Todos los pacientes incluidos contaban con biopsia del tumor primario o ganglio periférico y cada una de las muestras fueron procesadas con técnica de inmunohistoquímica avidina – biotina – peroxidada, para los marcadores CD10, Bcl2

y Ki67. Una vez confirmado el diagnóstico histológico de linfoma no Hodgkin de células B grandes CD20+, se inició el tratamiento con quimioterapia CHOP, CHOP-R o alguna otra según criterio del médico tratante, a dosis estándar internacionales.

Cada uno de los pacientes fue citado cada 3 semanas para revisión durante la cual se realizó exploración física dirigida a búsqueda de ganglios, masas o lesiones asociadas a enfermedad primaria o sistémica así como complicaciones asociadas a la quimioterapia tales como quimiotoxicidad de la médula ósea o infecciones oportunistas. En cada visita son medidas dichas masas o ganglios y se mantiene vigilancia de su comportamiento durante las visitas posteriores; se re-estadifica la clase funcional ECOG y se reinterroga por la presencia o persistencia de síntomas B. Se revisó biometría hemática y química sanguínea completa. Cuando hay evidencia de quimiotoxicidad de la médula ósea (citopenias agregadas) se difiere la administración de la dosis correspondiente de quimioterapia por una semana, aquellos paciente con neutropenia Grado 4 según la clasificación de la OMS reciben tratamiento ambulatorio con filgastrim.

El reporte de resultados de biopsia con técnicas de inmunohistoquímica se realizó de la siguiente manera: para la determinación de CD10 y BCL2 se visualizaron al menos 10 campos a 40x en microscopía de luz y se determinó positivo cuando en al menos 6 de dichos campos la tinción se observó positiva en al menos el 30% del

campo observado. Para la determinación de Ki67, la diferencia consiste en que se considera como positivo cuando en al menos 6 de los 10 campos observados la tinción se encuentra en un mínimo del 80% del campo.

Técnica de inmunohistoquímica: avidina – biotina – peroxidasa.

Se obtuvieron cortes histológicos de 3 μm de espesor en laminillas tratadas previamente con silano, a partir del bloque más representativo de la lesión; se utilizó un corte para cada una de las determinaciones BCL2, Ki67 y CD10, por métodos inmunohistoquímicos empleando el sistema EnVision + System Peroxidase (DAB) (DAKO Co. K 4007). Se procedió a la desparafinación de los cortes histológicos, los cuales fueron calentados a 60° C durante 15 minutos, posteriormente introducidos en forma secuencial en dos recipientes con xilol por 15 minutos cada uno.

1. Hidratación → Los cortes se introdujeron en una serie de alcoholes de concentraciones decrecientes, partiendo del absoluto, 96%, 70% y 50%, por 5 minutos en cada uno. Finalmente se colocaron en agua destilada durante 5 minutos.
2. Recuperación antigénica → el material histológico se colocó en solución recuperadora de antígeno (Target Retrieval Solution, DAKO Co S1699)

diluida 1:10. Posteriormente se calentó a 121° C por 10 minutos en autoclave.

Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se lavó con PBS por 5 minutos.

3. Bloqueo de peroxidasa endógena → Los cortes histológicos se introdujeron en una solución de peróxido de hidrógeno al 3% en metanol durante 20 minutos. Enseguida se lavaron con PBS por 5 minutos.
4. Anticuerpo primario → Se adicionó a cada laminilla 40 mL del anticuerpo monoclonal el cual se diluyó 1:200 en PBS distribuyéndose en forma homogénea sobre el corte histológico. La incubación se realizó a 37° C en cámara húmeda durante 30 minutos. Posteriormente se lavó en PBS por 5 minutos.
5. Sustrato-cromógeno → Se adicionó 1 a 2 gotas de sustrato - cromógeno (solución reguladora con H₂O₂, PH 7.5-3.3 diaminobenzidina, EnVision + System Peroxidase DAB, DAKO Co.).
6. Tinción de contraste → Los cortes histológicos se introdujeron en Hematoxilina de Harris durante 5 minutos, se lavaron con agua destilada por 5 minutos.
7. Deshidratación → Los cortes se introdujeron en una serie de alcoholes de concentraciones crecientes, partiendo de 50, 70, 96% y absoluto, durante 5 minutos en cada uno.

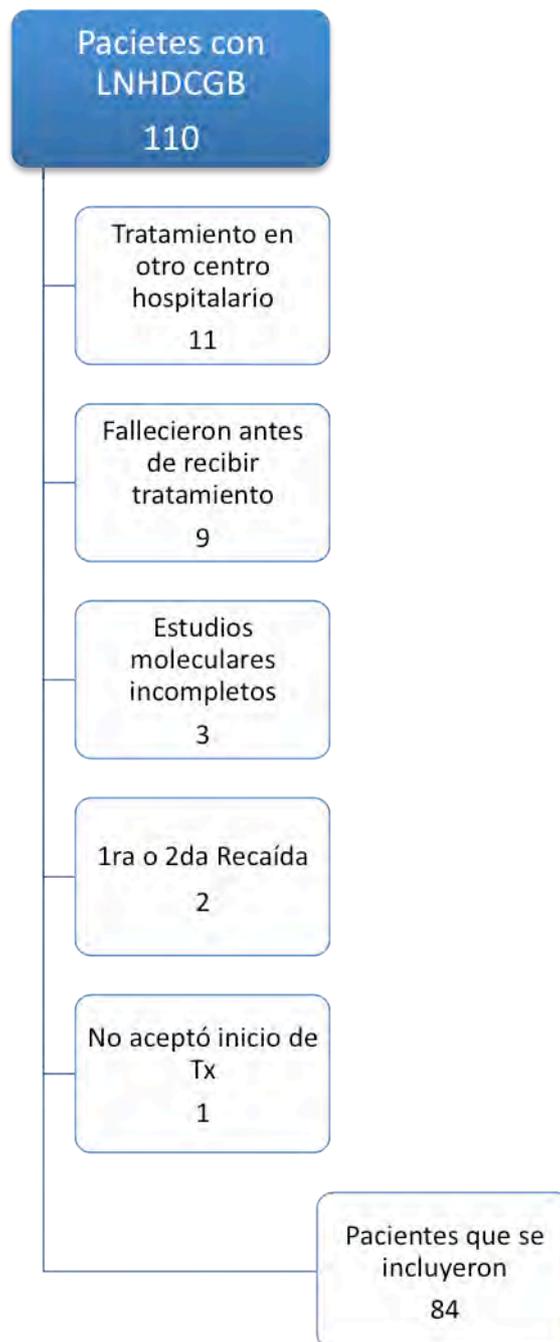
8. Transparentación → Las laminillas con los cortes se introdujeron de forma secuencial en dos recipientes con xilol por 15 minutos cada uno.

Montaje → Las laminillas se separaron preparadas de forma permanente con resina sintética Entellan (MERCK). ⁽¹⁹⁾

6. RESULTADOS

Características de los pacientes

Durante el periodo se diagnosticaron 110 pacientes con linfoma No Hodgkin de células B grandes, se incluyeron 84 pacientes, Los pacientes excluidos y los motivos para ello se describen en la Figura 3.



De los pacientes que se incluyeron, 40 fueron mujeres y 44 hombres, con edades entre 20 y 95 años. (Tabla 5)

Tabla 5. Edades.				
	Mínima	Máxima	Media	Dsv. Std.
Edad (años)	20	95	58.6	16.6

Para fines del estudio, se dividió al grupo en 2 subgrupos etáreos, menores de 60 años (41 pacientes) y de 60 años o más (43 pacientes) (Tabla 6).

Tabla 6. Características clínicas para IPI.			
Género		(n = 84)	%
	Mujer	40	47.6
	Hombre	44	52.4
Edad (años)			
	<60	41	48.8
	≥60	43	51.2
DHL			
	Normal	51	60.7
	Elevada	33	39.3
Estadio Clínico			
	Bajo (1 y 2)	35	41.6
	Avanzado (3 y 4)	49	58.4
ECOG			
	Bajo (0 y 1)	78	92.8
	Avanzado (≥2)	6	7.2
Síntomas B			
	Sin	30	35.7
	Con	54	64.3

Los estadios clínicos según la clasificación de Ann Arbor observados correspondieron a estadios avanzados 3 y 4 en el 58% de los pacientes. (Tabla 6)(Fig 4)

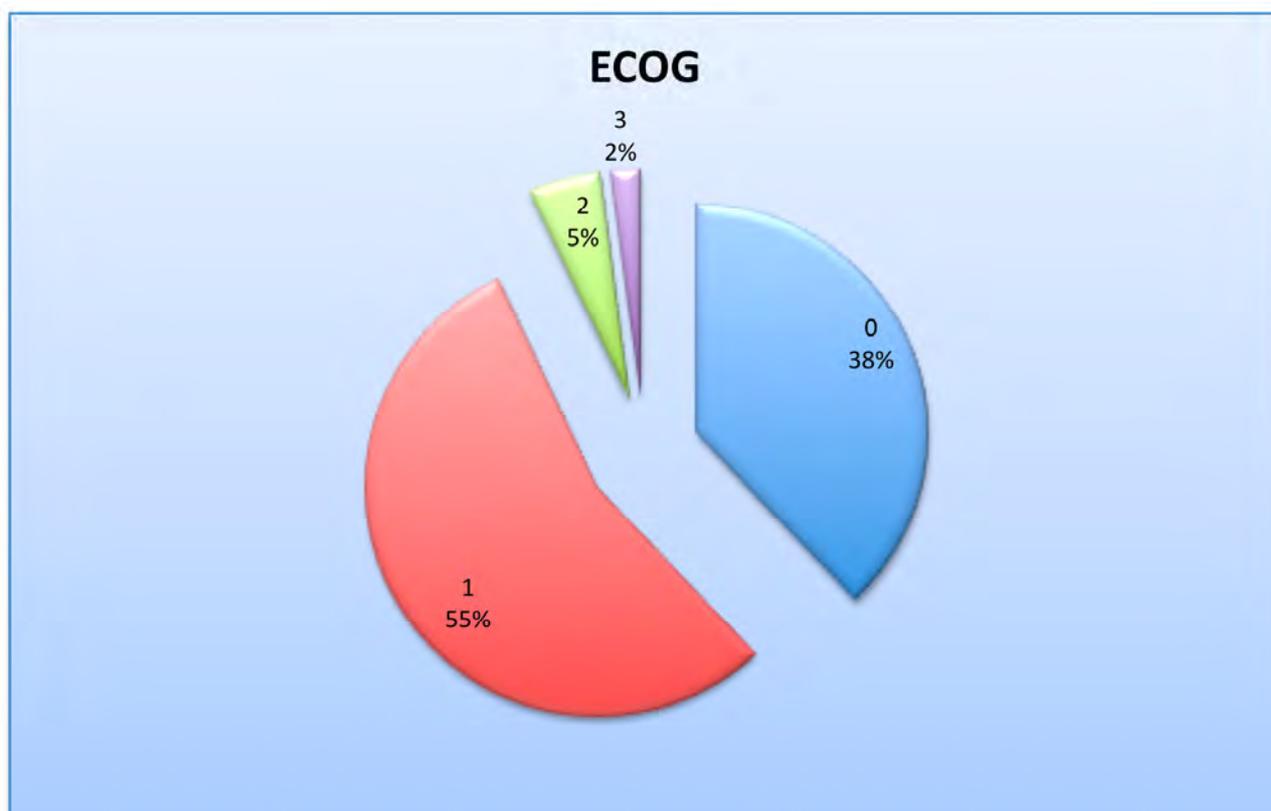
Figura 4.



Se midió la escala de desempeño según la Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) (24), encontrando a 35 pacientes en ECOG bajo (0 y 1) y 49 pacientes en ECOG avanzado (2 o más). (Tabla 6)(Fig. 5)

Se reportó la deshidrogenasa láctica (DHL) normal en 51 pacientes (60.7%) y DHL incrementada en 33 (39.3%).(Tabla 6) Se reportaron 30 pacientes sin síntomas B (35.7%) y 54 pacientes con síntomas B (64.3%). (Tabla 6)

Figura 5.



Se observó un Índice Pronóstico Internacional (IPI) de riesgo bajo (RB) en 27 pacientes, riesgo intermedio bajo (RIB) en 26 pacientes, riesgo intermedio alto (RIA) en 14 pacientes y riesgo alto (RA) en 17 pacientes. (Tabla 7)(Fig. 6)

Tabla 7. Riesgo IPI.			
Riesgo			
Bajo	27		32.1
Intermedio bajo	26		31.0
Intermedio alto	14		16.7
Alto	17		20.2

Figura 6.



La determinación de actividad tumoral en médula ósea se basó en los reportes histopatológicos del departamento de Patología humana División de Hematopatología, y se observaron 77 médulas óseas sin datos de infiltración tumoral y 7 con actividad tumoral. (Tabla 8)

Tabla 8. Infiltración tumoral de la médula ósea.		
Sin	77	91.7
Con	7	8.3

Se reportó 1 paciente con VIH y LNHDCGB con afección primara del SNC en estadio IVB, 1 paciente con VIH y LNHDCGB en estadio IVB extraganglionar

primario gástrico, 1 paciente con VIH estadio clínico IIB y 9 pacientes con LNH folicular G3.

Características clínicas y respuesta a la quimioterapia.

La respuesta clínica observada al término del tercer mes de quimioterapia en los 84 pacientes fue la siguiente: 10 pacientes no tuvieron respuesta y 74 pacientes tuvieron algún grado de respuesta, de la cual se observó a 16 pacientes con respuesta parcial a la quimioterapia y 58 pacientes con respuesta completa a la quimioterapia. (Tabla 9)(Fig. 7)

Tabla 9. Respuesta a la Quimioterapia.			
	(n = 84)	%	(n = 84)
Resp. completa	58	69.0	74
Resp. parcial o falla parcial	16	19.0	
Sin respuesta o falla completa	10	11.9	10

Figura 7.



La tasa de respuesta temprana a la quimioterapia de acuerdo a los indicadores del IPI se resumen en la Tabla 10.

Tabla 10. Características clínicas y respuesta a la quimioterapia

	(n = 84)	P	RR	IC 95%
Edad \leq60 años	39	0.049	5.16	1.04 – 25.55
Género hombre	37	0.319	0.42	0.10 – 1.78
DHL normal	48	0.021	5.12	1.24 – 21.01
Estadio Clínico bajo	34	0.022	8.71	1.06 – 71.65
Ausencia de síntomas B	27	0.739	1.56	0.38 – 6.40
ECOG bajo	71	0.002	20.28	3.13 – 131.16

Edad. Se observó una tasa de respuesta mayor en los sujetos menores de 60 años (RR 5.16, IC 95% 1.04 – 25.55; $p = 0.049$).

Género. No se observó una diferencia en la tasa de respuesta a la quimioterapia entre hombres y mujeres (RR 0.42, IC 95% 0.10 – 1.78; $p = 0.319$).

Deshidrogenasa láctica. Se observó una mayor tasa de respuesta a la quimioterapia en presencia de DHL elevada (RR 5.12, IC 95% 1.24 – 21.01; $p = 0.021$).

Estadio clínico Ann Arbor. Se observó una mayor tasa de respuesta a la quimioterapia en presencia de estadios clínicos menos avanzados (RR 8.71, IC 95% 1.06 – 71.65; $p = 0.022$).

Síntomas B. No se observó una diferencia en la respuesta a la quimioterapia en presencia de síntomas B (RR 1.56, IC 95% 0.38 – 6.40; $p = 0.739$).

Escala Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG). Se observó una tasa mayor de respuesta a la quimioterapia en presencia de un mejor desempeño ECOG (RR 20.28, IC 95% 3.13 – 131.16; $p = 0.002$).

Marcadores celulares y respuesta clínica. (Tabla 11)

CD10. Se aplicó la técnica de inmunohistoquímica a 81 biopsias (96.4% de la muestra total); al ser CD10 un marcador asociado a buen pronóstico, en el presente estudio se aplicó la prueba exacta de Fisher para asociar respuesta a la

quimioterapia con la presencia de CD10+. No se observó una mayor respuesta general a la quimioterapia en presencia de CD10+ (RR 0.52, IC 95%, 0.14 – 1.88; p = 0.341), ni tampoco una mayor tasa de respuesta completa a la quimioterapia (RR 0.69, IC 95% 0.18 – 2.68; p = 0.732). (Tabla 12)

Tabla 11. Marcadores		
	(n)	%
CD10+	33	39.3
CD10-	48	57.1
CD10 sin reporte	3	3.6
Bcl2+	63	75.0
Bcl2-	18	21.4
Bcl2 sin reporte	3	3.6
Ki67+	32	38.1
Ki67-	45	53.5
Ki67 sin reporte	7	8.4

Bcl2. Se aplicó la misma técnica de inmunohistoquímica a 81 biopsias (96.4% de la muestra total); al ser considerado un marcador de mal pronóstico se aplicó la prueba exacta de Fisher para asociar la falta de respuesta a la quimioterapia a la presencia de Bcl2. No se observó una tasa mayor de falla general de respuesta a la quimioterapia en presencia de Bcl2 (RR 0.93, IC 95%, 0.30 – 2.83; p = 1.000) y aunque hubo una tendencia hacia una tasa mayor de falla completa a la

quimioterapia, esta no alcanzó significancia estadística (RR 3.02, IC 95% 0.35 – 25.88; $p = 0.435$). (Tabla 12)

Ki67. Se aplicó la misma técnica de inmunohistoquímica a 77 biopsias (91.6% de la muestra total); al ser también considerado un marcador de mal pronóstico se aplicó la prueba exacta de Fisher para asociar la falta de respuesta a la quimioterapia a la presencia Ki67+. No se observó una tasa mayor de falla a la quimioterapia en presencia de Ki67+ (RR 0.78, IC 95%, 0.29 – 2.10; $p = 0.803$) ni de falla completa a la quimioterapia (RR 0.47, IC 95% 0.11 – 1.98; $p = 0.502$). (Tabla 12)

Tabla 12. Marcadores y respuesta a la quimioterapia.				
CD10+	(n)	P	RR	IC 95%
Con respuesta	27	0.341	0.52	0.14 – 1.88
Resp. Completa	23	0.732	0.69	0.18 – 2.68
BCI2+				
Falla	19	1.000	0.93	0.30 – 2.83
Falla completa	10	0.435	3.02	0.35 – 25.88
Ki67+				
Falla	9	0.803	0.78	0.29 – 2.10
Falla completa	3	0.502	0.47	0.11 – 1.98

En general, no se observó una asociación entre los marcadores de superficie evaluados y la tasa de respuesta a la quimioterapia, aunque la amplitud de los intervalos de confianza sugieren una falta de poder estadístico en algunos casos.

Para profundizar en el análisis, se llevó a cabo la evaluación de los siguientes subgrupos no pre-especificados inicialmente:

Infiltración a la médula ósea y respuesta a la quimioterapia. Se observó una tasa de menor respuesta general a la quimioterapia en presencia de infiltración tumoral de la médula ósea (RR 0.16, IC 95% 0.03 – 0.86; $p = 0.05$) y una tasa de menor respuesta completa a la quimioterapia (RR 0.12, IC 95% 0.02 – 0.75; $p = 0.037$). (Tabla 13)

Tabla 13. Infiltración tumoral de la médula ósea y respuesta a la quimioterapia.

	(n)	P	RR	IC 95%
Con respuesta	5	0.050	0.17	0.03 – 0.66
Resp. Completa	3	0.037	0.12	0.02 – 0.75

Marcadores e infiltración tumoral de la médula ósea.

CD10 e infiltración tumoral de la médula ósea. No se observó una menor tasa de infiltración tumoral de la médula ósea en presencia de CD10+ (RR 1.51, IC 95% 0.35 – 6.55; $p = 0.710$). (Tabla 14)

Tabla 14. Infiltración tumoral de la médula ósea y asociación a marcadores.

CD10+	4	0.710	1.51	0.35 – 6.55
Bcl2+	7	0.672	2.46	0.28 – 21.34
Ki67+	2	0.460	0.44	0.08 – 2.38

Bcl2 e infiltración tumoral de la médula ósea. No se observó una mayor tasa de infiltración tumoral de la médula ósea en presencia de Bcl2 (RR 2.46, IC 95% 0.28 – 21.34; $p = 0.672$). (Tabla 14)

Ki67 e infiltración tumoral de la médula ósea. No se observó una mayor tasa de infiltración tumoral de la médula ósea en presencia de Ki67+ de (RR 0.44, IC 95% 0.08 – 2.38; $p = 0.460$). (Tabla 14)

Respuesta clínica y asociación de rituximab al tratamiento. No se observó una mayor tasa de respuesta clínica a la quimioterapia en pacientes que recibieron tratamiento asociado a rituximab (RR 1.44, IC 95% 0.38 – 5.36; $p = 0.748$).

Indice Pronóstico Internacional (IPI) y marcadores. (Tabla 15)

CD10 e IPI de Riesgo alto. No se observó un IPI de mayor riesgo en presencia de CD10+ en este subgrupo (RR 1.51, IC 95% 0.44 – 5.17; p = 0.545).

Bcl2 e IPI de Riesgo alto. No se observó un IPI de mayor riesgo en presencia de Bcl2+ (RR 1.63, IC 95% 0.35 – 7.43; p = 0.716).

Ki67 e IPI de riesgo alto. Se observó una tendencia de asociación de IPI de riesgo mayor en presencia de Ki67+ (RR 0.25, IC 95% 0.07 – 0.9; p = 0.062) aunque no alcanzó significancia estadística.

Tabla 15. IPI de riesgo alto y marcadores.

Marcadores	IPI RA	P	RR	IC 95%
CD10+	8	0.545	1.51	0.44 – 5.17
Bcl2+	14	0.716	1.63	0.35 – 7.43
Ki67+	5	0.062	0.25	0.07 – 0.94

Respuesta a la quimioterapia e Índice pronóstico Internacional (IPI)

Respuesta a la quimioterapia e IPI de riesgo alto. Se observó una tasa menor de respuesta general a la quimioterapia en presencia de IPI de riesgo alto (RR 0.074, IC 95% 0.008 – 0.68; $p = 0.010$) y una tasa de menor respuesta completa a la quimioterapia (RR 0.07, IC 95% 0.007 – 0.68; $p = 0.014$). (Tabla 16)

Tabla 16. IPI de riesgo alto y respuesta a la quimioterapia.

IPI RA	(n)	P	RR	IC 95%
Con respuesta	12	0.010	0.07	0.008 – 0.68
Resp. Completa	8	0.014	0.07	0.007 – 0.68

7. DISCUSIÓN.

Como es de esperarse, en el presente estudio se demuestra que cada una de las características clínicas que conforman el Índice Pronóstico Internacional (edad, ECOG,⁽⁴⁾ estadio clínico de Ann Arbor, incremento de la DHL) pueden en conjunto y cada uno por separado predecir la respuesta a la quimioterapia,⁽¹³⁾ excepto la característica de la presencia de síntomas B, en la cual no se observó una asociación estadísticamente significativa, tal como se reporta en la literatura. Esto quizá se deba a una inadecuado registro de datos clínicos relevantes al momento de realizar la entrevista inicial con el paciente y su historia clínica lo que favorece que posteriormente sean subestimados en el seguimiento.

La intención del estudio fue buscar una asociación entre la presencia de los marcadores celulares CD10, Bcl2 y Ki67 y una respuesta clínica determinada. Basado en la literatura que describe a CD10₍₁₀₎₍₁₁₎ como marcador de buen pronóstico para la sobrevida, y a Bcl2 y Ki67 como marcadores de mal pronóstico para la sobrevida,⁽²⁰⁾⁽²¹⁾⁽¹⁴⁾ se esperaba una relación directa con la respuesta clínica temprana a la quimioterapia, lo que no fue posible demostrar en este estudio. Esto, probablemente debido a que la respuesta inicial a la quimioterapia no tiene una relación directa con la sobrevida, por lo que probablemente es necesario continuar

el seguimiento de estos pacientes en el tiempo y buscar posteriormente la asociación de dichos marcadores ya no con la respuesta a la quimioterapia u obtención de la remisión completa, si no con la sobrevida a largo plazo. En el caso del Bcl2 fue evidente un intervalo de confianza muy amplio tanto en el análisis principal como en todos los análisis secundarios, lo que sugiere que el tamaño de la muestra de sólo 81 biopsias sea insuficiente para otorgar suficiente poder estadístico.

En el caso de Ki67 siendo un marcador de mal pronóstico, es evidente la falta de tamaño de muestra; es plausible considerar que siendo un marcador de replicación celular,⁽¹⁴⁾ su presencia se asocie a una respuesta clínica al tratamiento ya que se sabe que el efecto de la quimioterapia depende de la tasa de replicación celular tumoral o índice de replicación, y como se describe en un estudio que incorpora las características clínicas comúnmente empleadas y Ki67, su análisis demuestra el efecto independiente de la proliferación celular en la sobrevida. ⁽¹⁴⁾

En el presente estudio no fue posible asociar el marcador CD10 con una respuesta clínica favorable o desfavorable, a diferencia de lo que demuestra la literatura, donde se describe como factor pronóstico cuya ausencia se asocia a comportamiento clínico desfavorable tal como mayor edad al momento de la presentación, morfología de mayor grado y proliferación difusa, particularmente el

linfoma folicular.⁽⁴⁾ Esta falta de asociación del CD10 con una respuesta clínica es probablemente atribuible a un tamaño de muestra insuficiente, ya que los otros estudios realizados cuentan con tamaño de muestra mayor. Otra respuesta posible es que la presencia de dichos marcadores celulares no guarden relación específicamente con la respuesta temprana a la quimioterapia.

Se realizó un subanálisis para evaluar la asociación de la infiltración tumoral de la médula ósea con la respuesta a la quimioterapia porque es un factor determinante en la clasificación del estadio clínico de Ann Arbor, ya que *per se* define un estadio clínico avanzado. Como era de esperarse se demostró una asociación entre la infiltración tumoral de la médula ósea y una menor respuesta a la quimioterapia. Al realizar el análisis por subgrupos de respuesta clínica es evidente que la infiltración tumoral de la médula ósea no predice la falta de respuesta a la quimioterapia en todos los subgrupos de respuesta clínica, particularmente aquellos con grados intermedios de respuesta al tratamiento, de tal manera que sólo es capaz de predecir la falla completa a la quimioterapia, sin asociarse a una respuesta parcial.

(4)(13)

También se realizó un subanálisis para asociar a los marcadores con la infiltración tumoral de la médula ósea; distinto a lo descrito, CD10 y Ki67 no demostraron la capacidad de predecir dicho comportamiento clínico. De igual manera a lo

comentado respecto a la predicción de respuesta en asociación a los marcadores, es probable que no sea posible observar esta asociación esperada debido que el presente estudio carece de un tamaño de muestra suficiente. ⁽¹⁰⁾⁽¹¹⁾⁽¹⁴⁾

Contrario a lo descrito en la literatura de especialidad, en el presente estudio no se observó ninguna diferencia en la respuesta a la quimioterapia asociado a la administración de rituximab. Esta diferencia no puede ser atribuida al tamaño de la muestra debido a que los artículos clásicos reportados en la presente década que definen la eficacia y seguridad clínica del rituximab, encuentran significancia estadística en muestras con menos de 20 pacientes y con seguimientos tan breves como 12 meses.⁽²²⁾ Estas diferencias de respuesta tampoco pueden ser atribuibles al tiempo de administración del rituximab, aunque actualmente el estándar es administrar una dosis de 375 mg/m² SC cada 2 meses hasta completar 8 dosis, al inicio de la experiencia clínica con el empleo de esta fármaco en la presente década se demostró que la administración de la misma dosis semanal en 4 semanas, es suficiente para asociarse a una sobrevida libre de evento de al menos 12 meses.⁽²³⁾

La observación de esta respuesta en particular en el presente estudio puede ser respondida con las observaciones realizadas en los estudios clínicos donde se ha encontrado que ocurre un cambio fenotípico en la célula posterior a la quimioterapia asociada a rituximab, donde los pacientes con linfoma CD20+ durante el tratamiento

desarrollan recurrencia o progresión de la enfermedad asociada a una transformación del linfoma a CD20- en un 26.3%, particularmente aquellos con linfoma folicular.⁽²⁴⁾ Para confirmar las observaciones de la falta de respuesta favorable con la quimioterapia asociada a rituximab en el presente estudio es necesario continuar el seguimiento de estos pacientes por lo menos 12 meses y buscar la asociación a sobrevida libre de evento así como extender la observación de todos aquellos pacientes que han recibido quimioterapia asociada a rituximab y definir la probable existencia de un comportamiento fenotípico particular en la población mexicana, la cual tendría un cambio morfológico temprano a linfoma CD20 negativo.

En la búsqueda de la asociación de los marcadores con el Índice Pronóstico Internacional, se observó una tendencia a la significancia estadística del marcador Ki67 como probable factor pronóstico independiente. Esta observación es congruente a lo descrito en artículos clásicos donde un alto índice de proliferación asociado a la expresión de Ki67 estima una sobrevida a 1 año del 18%, comparado con el 82% de los pacientes con bajo índice de proliferación.⁽¹⁴⁾ Es probable que de esta estimación se consiga significancia estadística si se cuenta con un tamaño de muestra superior, por lo que tendrá que ser confirmado en un estudio posterior.

Como era esperado, se observó una asociación de Índice Pronóstico Internacional de riesgo alto con respuesta a la quimioterapia disminuida en comparación con el grupo de pacientes con IPI de riesgo bajo. Esta asociación se encontró solamente en las comparaciones de los distintos tipos de respuesta a la quimioterapia posibles en el presente estudio y que involucran la respuesta completa. Esto no se observó en los subgrupos analizados con respuestas parciales. Estas observaciones interpretan que el IPI de riesgo alto predice una falla a la respuesta completa a la quimioterapia, lo cual es de importancia ya que a la fecha no ha sido posible encontrar un factor pronóstico que identifique al subgrupo de pacientes con el suficiente mal pronóstico clínico y que permita estratificar su tratamiento. ⁽¹⁴⁾

8. CONCLUSIONES.

Los marcadores de superficie CD10 e intracelulares Bcl2 y Ki67 no son capaces de predecir ningún tipo de respuesta temprana a la quimioterapia. La infiltración tumoral de la médula ósea predice por sí sola la falta de respuesta a la quimioterapia pero no es útil como factor pronóstico independiente para la respuesta al tratamiento. La presencia de los marcadores CD10, Bcl2 y Ki67 no se asocia a la infiltración tumoral de la médula ósea. El marcador Ki67 parece tener asociación a formas avanzadas de la enfermedad tal como el IPI de riesgo alto. La administración de Rituximab asociada a la quimioterapia no mejoró en este grupo la tasa de respuesta al tratamiento. El IPI sigue siendo una herramienta clínica pronóstica de utilidad en la predicción de respuesta al tratamiento y su traducción en sobrevida.

9. PALABRAS CLAVE.

Linfoma: conjunto de enfermedades neoplásicas cuyo origen se encuentra en el sistema linfático.

Linfoma de Hodgkin: neoplasia linfoide descrita en 1932, derivado de células B y caracterizada por la presencia de célula Reed – Sternberg.

Linfoma No Hodgkin: grupo heterogéneo de enfermedades neoplásicas que surgen como resultado de mutaciones somáticas de un progenitor linfoide B, T o NK.

Rituximab: anticuerpomonoclonal quimérico humano – murino, con regiones constantes humanas tipo IgG1 y porciones variables ligeras y pesadas murinas dirigidas contra la fosfoproteína transmembrana no glucosilada CD20 presente en 95% de las células B.

Respuesta temprana a quimioterapia: grado de respuesta a la quimioterapia que se mide clínicamente al término del 3er ciclo de quimioterapia, aproximadamente en la semana 21 desde el inicio del tratamiento.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. Greer J, Foerrster J, Rodgers G, Paraskevas F, Glader B, et al. (2008).
Wintrobe's Clinical Hematology. 12th ed. Chap. 90. USA: LWW (2008). ISBN-10:
0781765072 & ISBN-13: 9780781765077.
2. Greer J, Foerrster J, Rodgers G, Paraskevas F, Glader B, et al. (2008).
Wintrobe's Clinical Hematology. 12th ed. Chap. 89. USA: LWW (2008). ISBN-10:
0781765072 & ISBN-13: 9780781765077.
3. Küppers R, Klein U, Hansmann M y Rajewsky K; Cellular origin of Human B-Cell
lymphomas; N Eng J Med.1999;20:1520-27.
4. Sehn L; Optimal Use of Prognostic Factors in Non-Hodgkin Lymphoma;
Hematology. 2006;295-302.
5. Greer J, Foerrster J, Rodgers G, Paraskevas F, Glader B, et al. (2008).
Wintrobe's Clinical Hematology. 12th ed. Chap. 91. USA: LWW (2008). ISBN-10:
0781765072 & ISBN-13: 9780781765077.
6. Oken M, Creech R, Tormey D, Horton J, Davis T, et al.; Toxicity and response
criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group; Am J Clin Oncol.1982; 5:649-
55.

7. Hans C, Weisenburger D, Greiner T, Gascoyne R, Delabie J, et al.; Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray; *Blood*.2004 103: 275-282.
8. Suarez F, Lortholary O, Hermine O y Lecuit M; Infection-associated lymphomas derived from marginal zone B cells: a model of antigen-driven lymphoproliferation; *Blood*.2006;107:3034-44.2
9. The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma. *Blood*. 1997; 89: 3909–3918.
10. Karube K, Guo Y, Suzumiya J, Sugita Y, Nomura Y, et al.; CD10-MUM1+ follicular lymphoma lacks BCL2 gene translocation and shows characteristic biologic and clinical features; *Blood*.2007;109:3076-79.
11. Cutrona G, Leanza N, Ulivi M, Melioli G, Burgio V, et al.; Expression of CD10 by Human T Cells That Undergo Apoptosis Both In Vitro and In Vivo. *Blood*.1999;94: 3067-76.
12. Kramer M, Hermans J, Wijburg E, Philippo K, Geelen E, et al.; Clinical Relevance of BCL2, BCL6, and MYC Rearrangements in Diffuse Large B-Cell Lymphoma; *Blood*.1998;92:3152-62.

13. Rosenwald A, Wright G, Chan W, Connors J, Campo E, et al.; The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large B-cell lymphoma; *N Engl J Med.*2002;346:1937-47.
14. T Miller, T Grogan, S Dahlberg, C Spier, R Braziel, et al., Prognostic significance of the Ki-67-associated proliferative antigen in aggressive non-Hodgkin's lymphomas: a prospective Southwest Oncology Group trial; *Blood.*1994;83: 1460-66.
15. Hess M, Schwendinger M, Eskelinen E, Pfaller K, Pavelka M, et al.; Tracing uptake of C3dg-conjugated antigen into B cells via complement receptor type 2 (CR2, CD21); *Blood.* 2000;95:2617-23.
16. Huang N, Kawano M, Mahmoud M, Mihara K, Tsujimoto T, et al.; Expression of CD21 Antigen on Myeloma Cells and its Involvement in Their Adhesion to Bone Marrow Stromal Cells; *Blood.*1995;85:3704-12.
17. Barrans S, Fenton J, Banham A, Owen R, Jack A; Strong expression of FOXP1 identifies a distinct subset of diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) patients with poor outcome; *Blood.* 2004;104:2933-35.
18. Falini B, Fizzotti M, Pucciarini A, Bigerna B, Marafioti T, et al.; A monoclonal antibody (MUM1p) detects expression of the MUM1/IRF4 protein in a subset of germinal center B cells, plasma cells, and activated T cells; *Blood.* 2000;95:2084-92.

19. http://www.dakousa.com/index/prod_search/prod_products.htm?productareaid=38&baseprodidver=A107440004
20. Shen Y, Iqbal J, Huang J, Zhou G y Chan W; BCL2 protein expression parallels its mRNA level in normal and malignant B cells; *Blood*.2004;104:2936-39.
21. Monni O, Joensuu H, Franssila K, Klefstrom J, Alitalo K, et al.; BCL2 Overexpression Associated With Chromosomal Amplification in Diffuse Large B-Cell Lymphoma; *Blood*.1997;90:1168-74.
22. Rehwald U, Schulz H, Reiser M, Sieber M, Staak J, et al.; Treatment of relapsed CD20+ Hodgkin lymphoma with the monoclonal antibody rituximab is effective and well tolerated: results of a phase 2 trial of the German Hodgkin Lymphoma Study Group; *Blood*. 2003; 101:420-24.
23. Ghilmini M, Schmitz S, Cogliatti S, Pichert G, Hummerjohann J, et al.; Prolonged treatment with rituximab in patients with follicular lymphoma significantly increases event-free survival and response duration compared with the standard weekly X 4 schedule; *Blood*. 2004; 103:4416-23.
24. Hiraga J, Tomita A, Sugimoto T, Shimada K, Ito M, et al.; Down-regulation of CD20 expression in B-cell lymphoma cells after treatment with rituximab-containing combination chemotherapies: its prevalence and clinical significance: *Blood*. 2009; 113: 4885-93.

11. ÍNDICES.

Índice de Tablas.

Tabla 1: Clasificación de estadios de Ann Arbor.	Pág. 14
Tabla 2: Escala de desempeño ECOG.	Pág. 15
Tabla 3: Índice pronóstico internacional.	Pág. 17
Tabla 4: Índice pronóstico internacional ajustado a la edad.	Pág. 17
Tabla 5: Edades.	Pág. 27
Tabla 6: Características clínicas de los pacientes para el IPI.	Pág. 27
Tabla 7: Índice Pronóstico Internacional y Riesgos.	Pág. 29
Tabla 8: Infiltración tumoral de la médula ósea.	Pág. 30
Tabla 9: Respuesta a la quimioterapia.	Pág. 31
Tabla 10: Características clínicas del IPI y respuesta a la quimioterapia.	Pág. 32
Tabla 11: Presencia de marcadores celulares.	Pág. 34
Tabla 12: Marcadores celulares y respuesta a la quimioterapia.	Pág. 35
Tabla 13: Infiltración tumoral de la médula ósea y respuesta a la quimioterapia.	Pág. 36
Tabla 14: Infiltración tumoral de la médula ósea y asociación a marcadores.	Pág. 37

Tabla 15: IPI de Riesgo alto y marcadores celulares. Pág. 38

Tabla 16: IPI de Riesgo alto y respuesta a la quimioterapia. Pág. 39

Índice de Figuras.

Figura 1: Desarrollo de los linfocitos normales y neoplásicos. Pág. 11

Figura 2: Estructura anatómica de los ganglios linfáticos. Pág. 12

Figura 3: Pacientes del estudio. Pág. 26

Figura 4: Estadio Clínico de Ann Arbor. Pág. 28

Figura 5: ECOG por subgrupos. Pág. 29

Figura 6: IPI por grupos de riesgo. Pág. 30

Figura 7: Grados de respuesta clínica al 3er ciclo de quimioterapia. Pág. 32