



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA
BIOMEDICINA

**DETECCIÓN DE BIOMARCADORES METASTÁSICOS EN CÉLULAS TUMORALES
CIRCULANTES Y SU CORRELACIÓN CLÍNICA EN PACIENTES CON LINFOMA
DIFUSO DE CÉLULAS B GRANDES**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

BQD. CERÓN MALDONADO RAFAEL

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. IRMA OLARTE CARRILLO
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM
COMITÉ TUTOR: DRA. MARIA ISABEL SOTO CRUZ
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA, UNAM
DRA. LAILA GUTIÉRREZ KOBEH
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

CD. MX., ENERO, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

OFICIO CPCB/1199/2018

Asunto: Oficio de Jurado para Examen de Grado.

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 29 de octubre de 2018, aprobó el siguiente jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del alumno **CERÓN MALDONADO RAFAEL** con número de cuenta **307103871**, con la tesis titulada **"DETECCIÓN DE BIOMARCADORES METASTÁSICOS EN CÉLULAS TUMORALES CIRCULANTES Y SU CORRELACIÓN CLÍNICA EN PACIENTES CON LINFOMA DIFUSO DE CÉLULAS B GRANDES"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. IRMA OLARTE CARRILLO**:

Presidente:	DRA. SILVIA JIMÉNEZ MORALES
Vocal:	DRA. SANDRA DÍAZ BARRIGA ARCEO
Secretario:	DRA. LAILA GUTIÉRREZ KOBEH
Suplente:	DR. JUAN JOSÉ MONTESINOS MONTESINOS
Suplente:	DRA. MARÍA ISABEL SOTO CRUZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 13 de diciembre de 2018


DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA



AGRADECIMIENTOS

Al posgrado en Ciencias Biológicas UNAM por la formación académica recibida.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología "CONACyT" por apoyarme con la beca durante la realización del posgrado, por cual hago patente mi agradecimiento.

Al comité tutor formado por la Dra. Irma Olarte Carrillo, la Dra. María Isabel Soto Cruz y la Dra. Laila Gutiérrez Kobeh por sus sugerencias y apoyo durante el desarrollo del proyecto.

A Dios, por darme el don de la vida, por bendecirme a cada paso que doy y proporcionarme todos los medios para poder concluir satisfactoriamente mis estudios de maestría. Gloria a Dios.

A mis padres, por el apoyo, confianza y amor incondicional que siempre me han brindado.

A la Doctora Irma Olarte Carrillo, por la paciencia, consejos y por las enseñanzas que han contribuido a mi formación académica.

Al Doctor Adolfo Martínez Tovar, por la confianza y gran apoyo a lo largo de la realización del posgrado

A la Dra. Iveth, QFB Anel y BQD Adrián, por su valiosa cooperación, gran compañerismo y el aliento que siempre me brindaron

Al personal médico del servicio de Hematología, en especial al Dr². Christian Ramos Peñafiel, Dr. Efreem Montaña Figueroa, Dr. Juan Julio Kassack, Dra. Etta Rozen y Dr. Juan Collazo Jaloma, así como a los médicos residentes por su apoyo en la realización del proyecto.

A los miembros del jurado para el examen de grado, Dra. Silvia Jiménez Morales, Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo, Dra. Laila Gutiérrez Kobeh, Dra. María Isabel Soto Cruz y al Dr. Juan José Montesinos Montesinos, por todas sus sugerencias y comentarios para mejorar el trabajo de tesis

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Biología Molecular U-204 del Hospital General de México. Dr. Eduardo Liceaga, Secretaría de Salud, bajo la dirección de la Dra. Irma Olarte Carrillo y la supervisión del comité tutorial, conformado por la Dra. Laila Gutiérrez Kobeh y la Dra. María Isabel Soto Cruz

Este trabajo fue apoyado por la Dirección de Investigación del Hospital General de México. Dr. Eduardo Liceaga por el proyecto con número de registro DIC/08/204/04/017

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS
 ÍNDICE DE GRÁFICOS
 ÍNDICE DE TABLAS
 ABREVIATURAS

1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT	2
3. MARCO TEÓRICO	3
3.1 Biomarcadores circulantes	3
3.2 Células Tumorales Circulantes (CTCs)	3
3.3 Identificación de CTCs	6
3.3.1 Enriquecimiento	6
3.3.2 Detección	8
3.3.3 Biomarcadores para la detección de CTCs	10
3.3.3.1 Marcador de proliferación, <i>KI67</i>	10
3.3.3.2 Resistencia a la apoptosis, <i>BCL6</i> , <i>BCL10</i>	11
3.3.3.3 Inducción de angiogénesis, <i>VEGFR1</i>	12
3.3.3.4 Invasión y metástasis, <i>CK19</i> , <i>TWIST1</i>	13
3.3.3.5 Inmortalidad replicativa, <i>hTERT</i>	14
3.3.3.6 Inestabilidad genómica, <i>MAGE-A3</i>	15
3.4 Linfoma Difuso de Células B Grandes (LDCBG)	18
3.4.1 Clasificación	18
3.4.2 Epidemiología	19
3.4.3 Etiología	19
3.4.4 Diagnóstico	22
3.4.5 Hallazgos clínicos	22
3.4.6 Tratamiento	22
3.4.7 Factores pronósticos	23
3.4.7.1 Clínicos	23
3.4.7.2 Sitios extranodales	24
3.4.7.3 Inmunológicos	25
3.4.7.4 Rearreglos cromosómicos	26
4 JUSTIFICACIÓN	28
5 HIPÓTESIS	29
6 OBJETIVOS	30
7 DISEÑO EXPERIMENTAL Y POBLACIÓN DE ESTUDIO	31
7.1 Criterios de inclusión, exclusión y eliminación	31
7.2 Variables de estudio	31
7.3 Tamaño de la muestra	33
8. METODOLOGÍA	34
8.1 Muestras biológicas	34
8.2 Enriquecimiento de CTCs	35
8.3 Extracción de RNA de células de individuos sanos, pacientes y líneas celulares	35
8.4 Determinación de la integridad y cuantificación del RNA	35
8.5 Síntesis de DNA complementario (cDNA)	35
8.6 Diseño de primers	36
8.7 Determinación de los niveles de expresión de biomarcadores en individuos sanos y pacientes con LDCBG por RT-qPCR	36
8.8 Secuenciación de los productos de RT-PCR	37

9. RESULTADOS	38
9.1 Caracterización clínico-patológica de pacientes con LDCBG	38
9.2 Análisis de la integridad del material genético	39
9.3 Estandarización de la amplificación de biomarcadores metastásicos	40
9.4 Secuenciación de productos de RT-PCR	43
9.5 Expresión de biomarcadores en sangre periférica de individuos sanos	44
9.6 Niveles de expresión de biomarcadores metastásicos en pacientes con LDCBG al diagnóstico (T0)	45
9.7 Co-expresión de biomarcadores en pacientes con LDCBG al diagnóstico (T0)	48
9.8 Correlación de biomarcadores y parámetros clínicos de pacientes con LDCBG al diagnóstico (T0)	50
9.9 Análisis de supervivencia global y sobrevida libre de eventos en pacientes con LDCBG al diagnóstico (T0)	53
9.10 Niveles de expresión de biomarcadores metastásicos en pacientes con LDCBG a la mitad (T1) y al final (T2) del tratamiento	56
9.11 Co-expresión de biomarcadores en pacientes con LDCBG a la mitad (T1) y al final (T2) del tratamiento	59
10. DISCUSIÓN	61
11. CONCLUSIONES	68
12. PERSPECTIVAS	69
13. LITERATURA CITADA	70
14. ANEXOS (CONGRESOS)	75

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Procesos secuenciales de generación de metástasis	5
Figura 2. Metástasis derivada de ganglio linfático	5
Figura 3. Métodos de identificación de CTCs	6
Figura 4. Técnicas de enriquecimiento de CTCs	7
Figura 5. Detección de CTCs mediante los métodos de CellSearch e ISET	8
Figura 6. Patrón de expresión diferencial entre CTCs y células mononucleares de individuos sanos	9
Figura 7. Características de células tumorales para la detección de CTCs	10
Figura 8. Expresión de <i>KI67</i> y sobrevida global de pacientes con LDCBG	11
Figura 9. Expresión de <i>BCL6</i> y sobrevida global de pacientes con LDCBG	12
Figura 10. Expresión de <i>VEGF-A</i> y <i>VEGFR 1/2</i> en LDCBG	13
Figura 11. Niveles de expresión de <i>hTERT</i> y <i>MYC</i> en LNH	15
Figura 12. Control de expresión de los CTAs en células somáticas, germinales y neoplásicas	16
Figura 13. Expresión de <i>MAGE-A3</i> y sobrevida global de pacientes con LDCBG	17
Figura 14. Morfología del linfoma difuso de células B grandes	18
Figura 15. Vías afectadas durante la linfomagénesis en LDCBG del centro germinal y célula B activada	20
Figura 16. 50 principales genes mutados en LDCBG	21
Figura 17. Sobrevida global de acuerdo al índice pronóstico internacional - revisado	24
Figura 18. Sobrevida global y sobrevida libre de eventos de acuerdo al subtipo de LDCBG	25
Figura 19. Algoritmo de Hans para subclasificación histológica del LDCBG	26
Figura 20. Ciclos de tratamiento de pacientes con LDCBG y momentos de la toma de muestra	34
Figura 21. Determinación de la integridad de RNA de muestras biológicas	40
Figura 22. PCR multiplex de los genes constitutivos <i>β2-microglobulina</i> y <i>GAPDH</i>	40
Figura 23. Biomarcadores obtenidos a partir de línea celulares onco-hematológicas	40
Figura 24. Niveles de expresión de biomarcadores <i>KI67</i> , <i>BCL6</i> , <i>BCL10</i> , <i>CK19</i> , <i>VEGFR1</i> , <i>TWIST1</i> , <i>hTERT</i> y <i>MAGE-A3</i> en líneas celulares	42
Figura 25. Alineación en BLAST (NCBI) de la secuencia del biomarcador <i>KI67</i>	43
Figura 26. Determinación de los niveles de expresión de los genes <i>KI67</i> , <i>BCL6</i> , <i>BCL10</i> , <i>CK19</i> y <i>VEGFR1</i> en individuos sanos	44
Figura 27. Determinación de los niveles de expresión de los biomarcadores <i>KI67</i> , <i>BCL6</i> , <i>BCL10</i> , <i>CK19</i> , <i>VEGFR1</i> en individuos sanos y pacientes con LDCBG <i>de novo</i>	45
Figura 28. Análisis de supervivencia global y sobrevida libre de eventos de pacientes con LDCBG en relación a la expresión de <i>BCL6</i>	53
Figura 29. Análisis de supervivencia global y sobrevida libre de eventos de pacientes con LDCBG en relación a la expresión de <i>hTERT</i>	54
Figura 30. Análisis de supervivencia global y sobrevida libre de eventos de pacientes con LDCBG en relación al número de genes específicos de tumor expresados	55
Figura 31. Análisis de supervivencia global y sobrevida libre de eventos de pacientes con LDCBG en relación al número de genes específicos de tumor expresados	55
Figura 32. Determinación de los niveles de expresión de los biomarcadores en individuos sanos y pacientes con LDCBG al diagnóstico (T0), a la mitad (T1) y al final (T2) del tratamiento	57

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de los LDCBG	19
Tabla 2. Esquema de tratamiento de LDCBG	23
Tabla 3. Tasa de respuesta al tratamiento con R-CHOP	23
Tabla 4. Desenlace de acuerdo al R-IPI en pacientes tratados con R-CHOP	24
Tabla 5. Variables de estudio	32
Tabla 6. Primers para la amplificación de biomarcadores	36
Tabla 7. Características clínico-patológicas de pacientes con LDCBG en seguimiento al diagnóstico (T0)	39
Tabla 8. Determinación de biomarcadores moleculares en líneas celulares hematológicas por PCR en punto final	41
Tabla 9. Frecuencia de expresión de biomarcadores en pacientes con LDCBG al diagnóstico (T0)	47
Tabla 10. Frecuencia de expresión y co-expresión de biomarcadores	48
Tabla 11. Descripción de los biomarcadores co-expresados al diagnóstico	49
Tabla 12. Correlación de la expresión de biomarcadores y parámetros clínicos de los pacientes con LDCBG al diagnóstico T0	52
Tabla 13. Frecuencia de expresión de biomarcadores en pacientes con LDCBG a la mitad (T1) y al final (T2) del tratamiento	57
Tabla 14. Frecuencia de co-expresión de biomarcadores en pacientes con LDCBG a la mitad (T1) y al final (T2) del tratamiento	59
Tabla 15. Descripción de los biomarcadores co-expresados a T1 y a T2	60

ABREVIATURAS

DNA	Ácido desoxirribonucleico
cfDNA	Ácido desoxirribonucleico fuera de las células
ctDNA	Ácido desoxirribonucleico circulante de tumor
CTCs	Células Tumorales Circulantes
NGS	Secuenciación de siguiente generación
RNA	Ácido ribonucleico
LH	Linfoma de Hodgkin
LDCBG	Linfoma Difuso de Células B Grandes
ISET	Aislamiento de células tumorales epiteliales por tamaño
DEP	Dielectroforesis
EpCAM	Molécula de adhesión de células epiteliales
CK	Citoqueratinas
CAM	Matriz de adhesión celular
GFP	Proteína Verde Fluorescente
FDA	Administración de alimentos y medicamentos
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
FISH	Hibridación Fluorescente In Situ
kDa	Kilo Daltones
R-CHOP	Rituximab-Ciclofosfamida Hidroxicloruro Prednisona Oncovin
R-EPOCH	Rituximab-Etoposido Prednisona Oncovin Ciclofosfamida Hidroxicloruro
EMT	Transición epitelio-mesenchimal
LCM	Linfoma de Células del Manto
LF	Linfoma Folicular
VEGFR-1	Receptor del factor de crecimiento endotelial vascular receptor 1
BCL	B Cell Lymphoma
CTAs	Antígenos Testiculares de Cáncer
MAGE	Antígeno de melanoma
HDAC	Histona desacetilasa
ECM	Matriz Extracelular
OMS	Organización Mundial de la Salud
CG	Centro Germinal
CBA	Célula B Activa
LNH	Linfoma No Hodgkin
SEER	Vigilancia, epidemiología y resultados finales
EBV	Virus de Epstein Barr
TAC	Tomografía Axial Computarizada
PET	Tomografía por Emisión de Positrones
LDH	Lactato Deshidrogenasa
IPI	Índice Pronóstico Internacional
R-IPI	Índice Pronóstico Internacional - Revisado
ECOG	Estado Funcional (Eastern Cooperative Oncology Group)
PFS	Sobrevivencia libre de eventos
OS	Sobrevivencia global
DHL	Linfoma Doble Hit
THL	Linfoma Triple Hit
T0	Tiempo 0 (al diagnóstico)
T1	Tiempo 1 (a la mitad del tratamiento)
T2	Tiempo 2 (al finalizar el tratamiento)
cDNA	DNA complementario

1. RESUMEN

Las biopsias líquidas para identificación de Células Tumorales Circulantes (CTCs) han sido utilizadas en la actualidad como herramienta diagnóstica, pronóstica, en la determinación de decisiones terapéuticas y como parte del monitoreo de la enfermedad a lo largo del tratamiento en pacientes oncológicos. Sin embargo, en Linfoma Difuso de Células B Grandes (LDCBG), únicamente se utilizan los factores clínicos y de imagenología para dichas determinaciones. Por tal motivo, en el presente estudio se analizó un panel de biomarcadores moleculares implicados en procesos oncogénicos como proliferación celular (*KI67*), alteraciones en apoptosis (*BCL6*, *BCL10*), invasión y metástasis (*CK19*, *TWIST1*), angiogénesis (*VEGFR1*), inmortalidad replicativa (*hTERT*) e inestabilidad genómica (*MAGE-A3*) con el objetivo de conocer las implicaciones clínicas de la determinación de los niveles de expresión de estos en biopsias líquidas. Se determinaron mediante RT-qPCR los niveles de expresión del panel de biomarcadores metastásicos en células mononucleares de 60 individuos sanos y 60 pacientes con LDCBG al diagnóstico (T0), encontrando sobre expresión de *KI67*, *BCL6*, *BCL10*, *CK19* y *VEGFR1* en los pacientes con LDCBG en comparación con los individuos sanos ($p < 0.05$). Los genes específicos de tumor *TWIST1*, *hTERT* y *MAGE-A3* se encontraron expresados únicamente en pacientes. Se utilizaron líneas celulares de origen onco-hematológico como controles positivos. A su vez, se encontró asociación entre la sobre expresión de *KI67* y la presencia de sitios extranodales ($p < 0.05$), así como la sobre expresión de *BCL6* y presencia de *hTERT* con un comportamiento clínico adverso reflejado en la supervivencia global y libre de eventos ($p < 0.05$). Por otra parte, en el seguimiento de 30 pacientes con LDCBG se encontró que la sobre expresión de *BCL6* a la mitad de tratamiento (T1) y al finalizar el mismo (T2), se relacionó con refractariedad al esquema de tratamiento R-CHOP. Del mismo modo, se encontró expresión de los genes específicos de tumor *TWIST1*, *hTERT* y *MAGE-A3* a T1 y T2, confirmando la importancia de la determinación de biomarcadores moleculares en el monitoreo de los casos de LDCBG. En el presente estudio se sugiere la importancia de realizar biopsias líquidas en neoplasias hematológicas, debido a su funcionalidad en los casos de LDCBG.

2. ABSTRACT

The liquid biopsies for the identification of Circulating Tumor Cells (CTCs), have been developed at present, as a diagnostic and prognostic tool, in the determination of therapeutic decisions and as part of the monitoring of the disease throughout the treatment in oncologic patients. However, in Diffuse Large B-Cell Lymphoma (DLBCL), only clinical and imaging factors are used for these determinations. For this reason, in the present study we analyzed a panel of molecular biomarkers involved in oncogenic processes such as cell proliferation (*KI67*), alterations in apoptosis (*BCL6*, *BCL10*), invasion and metastasis (*CK19*, *TWIST1*), angiogenesis (*VEGFR1*), immortality replicative (*hTERT*) and genomic instability (*MAGE-A3*), in order to know the clinical implications of the determination of the expression levels of these in liquid biopsies. The expression of the metastatic biomarkers in mononuclear cells from 60 healthy individuals and 60 patients with LDCBG at diagnosis (T0) were determined by RT-qPCR, finding over expression levels of *KI67*, *BCL6*, *BCL10*, *CK19* and *VEGFR1* in patients with LDCBG versus healthy donors ($p < 0.05$). Tumor-specific genes *TWIST1*, *hTERT* and *MAGE-A3* were expressed in DLBCL patients but not in healthy donors. We used onco-hematological cell lines as positive controls. Additionally, an association was found between the over expression of *KI67* and the presence of extranodal sites ($p < 0.05$), as well as the over expression of *BCL6* and the presence of *hTERT* with adverse clinical behavior reflected in overall survival and event free survival ($p < 0.05$). On the other hand, over-expression of *BCL6* at half treatment (T1) and at the end of treatment (T2), was related to cases of refractoriness to the treatment scheme R-CHOP. Similarly, expression of tumor-specific genes was found in T1 and T2, confirming the importance of the determination of molecular biomarkers in the monitoring of cases of DLBCL. In the present study, the importance of carrying out liquid biopsies in hematological neoplasms is suggested, due to its functionality in cases of LDCBG.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. Biomarcadores circulantes

En el campo de la investigación en cáncer se ha propuesto el análisis de biomarcadores en sangre periférica (biopsias líquidas) que puedan ser integrados a los hallazgos clínicos para obtener mejores resultados en el tratamiento de los pacientes. Las biopsias líquidas son pruebas no invasivas en las que se utiliza sangre o fluidos orgánicos en donde se puedan detectar productos provenientes de Tumores Primarios o Metastásicos, como células, o fragmentos de ácidos nucleicos y proteínas. En la actualidad se han establecido 3 análisis detectables en biopsias líquidas: DNA fuera de las células (cfDNA, cell-free DNA) o DNA circulante de tumor (ctDNA), exosomas y Células Tumorales Circulantes (CTCs). Los cfDNA o ctDNA son fragmentos de DNA cortos liberados por las células cancerosas, posterior a eventos de apoptosis o necrosis. El estudio del cfDNA comprende un área activa de la investigación en cáncer debido a que este proporciona bastante información acerca de la biología del cáncer, haciendo uso de la Secuenciación de Siguiete Generación. (NGS, Next-Generation Sequencing). Los exosomas también son un tema atractivo en el campo de investigación en cáncer, ya que se ha demostrado su papel en la comunicación intercelular, a través de la migración de pequeñas vesículas de membranas que contienen biomoléculas funcionales (proteínas, RNA y DNA) que pueden ser transportadas hacia prácticamente cualquier sitio anatómico. A los exosomas derivados de tumor se les ha atribuido la función de preparar favorablemente el microambiente de sitios específicos para futuros eventos metastásicos. Las CTCs son células cancerosas circulantes que son liberadas directamente del tumor primario (o de tumores secundarios), las cuales, cumpliendo ciertas condiciones, tienen la capacidad de anclarse e infiltrarse en cualquier tejido sano diferente al de su origen, y así generar un nuevo crecimiento tumoral (metástasis).^{1,2}

3.2. Células Tumorales Circulantes (CTCs)

Las CTCs son representantes de los tumores primarios en el sistema sanguíneo o linfático. Su identificación fue descrita por primera vez hace más de 150 años por Thomas Ashworth, quien observó células con morfología inusual en la sangre de un paciente que había muerto a consecuencia del cáncer. Ashworth consideró el posible origen tumoral de estas células debido a características morfológicas comunes con el tejido tumoral sólido.³ Con base en este y en diversos estudios, ahora se conoce que las células malignas liberadas del tumor primario invaden capilares cercanos viajando por el torrente sanguíneo, por ello se les conoce como células tumorales circulantes (CTC). Al adherirse a las paredes de los capilares y escapar del vaso sanguíneo (extravasación) pueden establecerse en otro órgano diferente al del tumor

primario generando metástasis. Sin embargo, las CTC no se establecen en un tejido u órgano al azar. En 1889 Stephen Paget propuso la teoría del suelo y la semilla, misma que sostiene que ciertas células tumorales (semillas) tienen afinidad para implantarse en las condiciones de un órgano particular (suelo) y cuando ambas condiciones se dan se propicia la metástasis ^{4,5}

En diversos estudios se ha encontrado que las células tumorales se desprenden del tumor primario en las etapas iniciales de la progresión maligna, pero aún en pacientes con cáncer metastásico avanzado, las CTC representan un bajo porcentaje de CTCs por mL de sangre, encontrando hasta 5 células tumorales por mL. Las CTCs circulan junto a las células sanguíneas normales por el torrente sanguíneo en donde permanecen irreconocibles en los frotis de sangre periférica de rutina y son difíciles de detectar incluso utilizando instrumentación sofisticada. Si las CTCs llegasen a estar presentes en circulación estas representan solo una fracción de 0.0001% de todas las células nucleadas. ⁶

Se ha demostrado la presencia de CTCs en diversos tipos de cáncer. Por ejemplo, numerosos estudios muestran la asociación de la presencia de CTCs con un pronóstico desfavorable en pacientes con melanoma y sarcoma. Sin embargo, en carcinomas es en donde se ha enfocado con mayor frecuencia el estudio de las CTCs y su papel en la generación de metástasis. ⁶⁻⁹

La prevalencia de CTCs en pacientes con cáncer metastásico difiere con el tipo y estadio del carcinoma. En cáncer de mama temprano (sin metástasis) se han detectado CTCs en 18-30% de las pacientes, en comparación con el 70% de detección en pacientes con actividad metastásica. Las CTCs han sido detectadas en cáncer de pulmón, colon, mama, recto, gástrico, ovárico, próstata y Linfoma de Hodgkin (LH), entre otros tipos de cáncer. En otros estudios se han encontrado CTCs en 70 - 100% de los pacientes con metástasis, así como en 46 - 71% de pacientes con afectación local aún en estadios tempranos del cáncer. ⁷

Las CTCs presentes en sangre periférica pueden tener la capacidad, o no, de generar crecimientos metastásicos en órganos distantes del tumor primario. La metástasis en cáncer ocurre cuando células cancerosas se disocian del tumor primario y migran a órganos distantes a través de los sistemas sanguíneo o linfático. La metástasis es un proceso complejo que requiere cambios en el fenotipo de las células, conocido como transformación epitelio-mesenquimal (EMT), que posterior a que las células del tumor primario proliferen y logren la invasión local; provoca que las células cancerosas pierdan la capacidad de adhesión célula-célula y atraviesen los vasos sanguíneos y/o linfáticos más cercanos (intravasación), para

posteriormente migrar a través del sistema circulatorio y linfático, seguido del escape de las células tumorales de la luz de los vasos sanguíneos hacia el parénquima de tejidos distantes (extravasación). Las células que han infiltrado tejido sano comienzan a formar pequeños nódulos de células cancerosas (micrometástasis), y finalmente, el crecimiento de las lesiones micrometastásicas hacia tumores macroscópicos para culminar la colonización (Figura 1).¹⁰⁻¹²

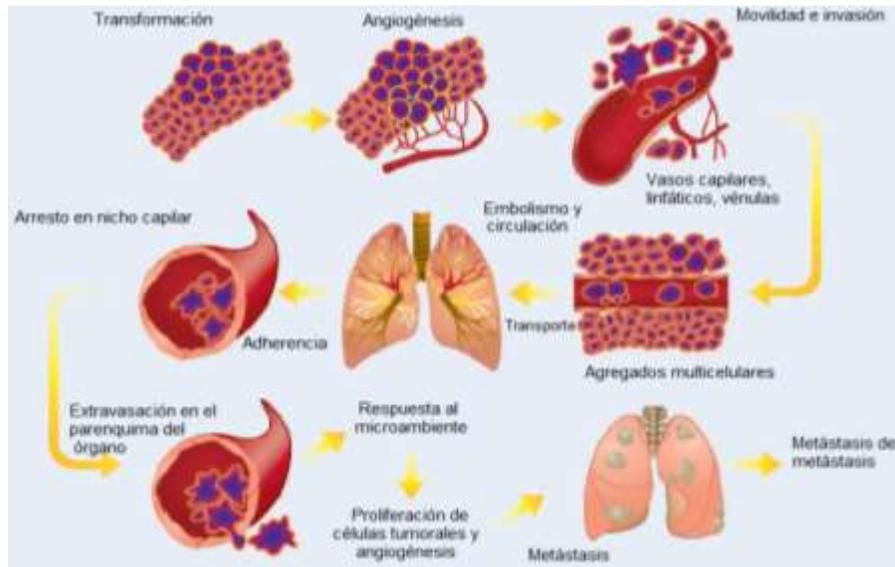


Figura 1. Procesos secuenciales de generación de metástasis. El proceso de metástasis consiste en pasos secuenciales, interrelacionados y selectivos. (Tomada de Talmadge y Fidler, 2010)¹⁰

De igual manera, la metástasis y liberación de CTCs en casos de linfoma, se ha caracterizado en pacientes con LH y en Linfoma No Hodgkin (LNH), encontrándolas en 40 – 50% de casos con enfermedad diseminada (Figura 2).¹³

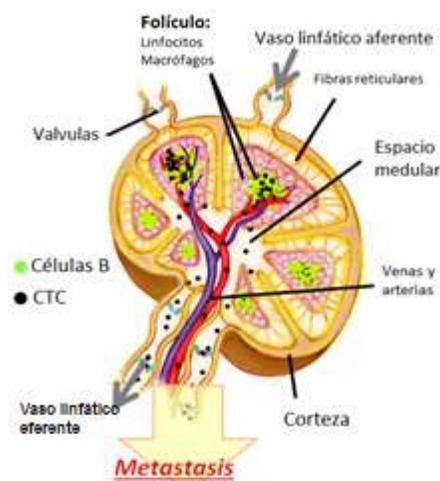


Figura 2. Metástasis derivada de ganglio linfático. Las CTCs con potencial metastásico salen del ganglio linfático del tumor a través de vasos linfáticos eferentes, migrando así al siguiente ganglio (Tomada de Gharbaran, *et al*, 2014)¹³

La capacidad para detectar CTCs en sangre periférica de pacientes con cáncer, incluido el LDCBG, es muy prometedora, y se han desarrollado tecnologías para este propósito en los últimos años. Sin embargo, la detección de CTC sigue siendo técnicamente desafiante. Su identificación y caracterización requieren métodos de alta sensibilidad y especificidad, que generalmente consisten en una combinación de procedimientos de enriquecimiento y detección.¹⁴

3.3 Identificación de CTCs

Las CTCs pueden distinguirse de las células normales de la sangre periférica mediante características físicas y biológicas diferenciales. Para identificarlas se requieren técnicas sensibles y específicas que permitan su correcta detección, dado que la cantidad de CTC en sangre periférica, incluso en pacientes con un proceso metastásico en curso, no supera el índice de una CTC por cada 10^5 células leucocitarias. Es por ello que para su detección se debe iniciar con una fase de enriquecimiento, seguida del proceso de detección (Figura 3).^{5,15}

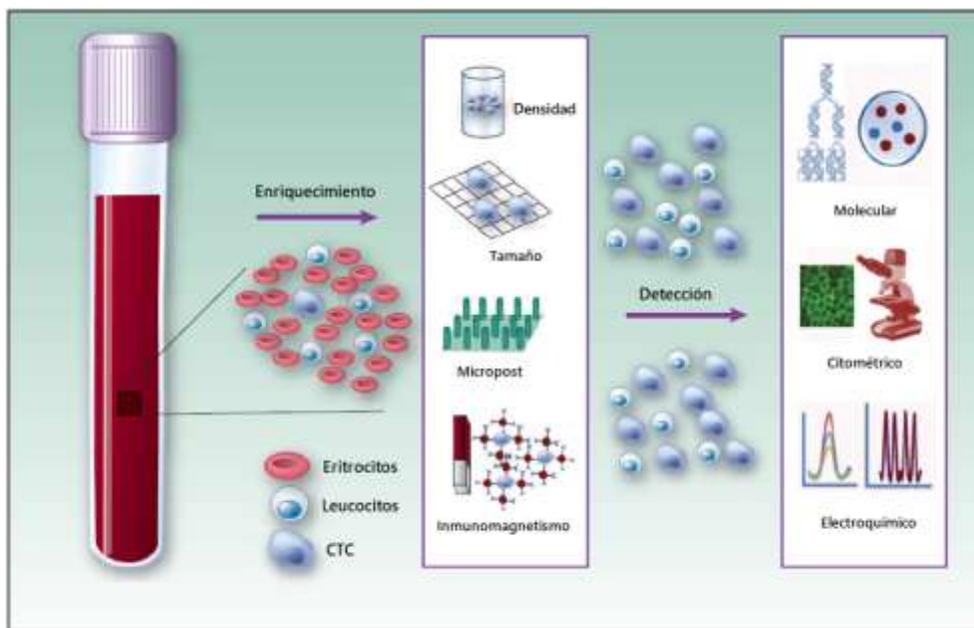


Figura 3. Métodos de identificación de CTCs. Representación esquemática de los métodos de enriquecimiento y detección de CTCs. (Tomada de Yap, *et al*, 2014)¹⁵

3.3.1 Enriquecimiento

Los métodos de enriquecimiento basados en las propiedades físicas y biológicas de las CTCs se dividen en técnicas dependientes de marcaje (expresión diferencial de proteínas de membrana), y no dependientes de marcaje (enriquecimiento por propiedades físicas de las CTCs).⁶

Los métodos de enriquecimiento basados en las propiedades físicas incluyen: centrifugación por gradiente de densidad (Ficoll-Hypaque), filtración a través del membranas (Filtro ISET, *Isolation by Size of Epithelial Tumor cells*) y por dielectroforésis (DEP, *dielectrophoresis*), así como por citometría de flujo. La ventaja de utilizar las propiedades físicas para el enriquecimiento es la separación sin realizar algún tipo de marcaje a las CTCs.⁶

De acuerdo a las propiedades biológicas de las células tumorales, se pueden realizar técnicas de enriquecimiento mediante ensayos inmunomagnéticos; utilizando anticuerpos dirigidos hacia antígenos específicos de tumor (selección positiva) o el antígeno común de leucocitos CD45 (selección negativa). Dichos inmunoensayos tiene como objetivo seleccionar células con antígenos tumorales específicos mediante al acoplamiento de anticuerpos ensamblados a un compuesto magnético. Posteriormente, el complejo antígeno-anticuerpo es seleccionado y separado en un campo magnético. La selección positiva se lleva a cabo con anticuerpos dirigidos a moléculas de adhesión de células epiteliales (EpCAM, *Epithelial Cell Adhesion Molecule*), citoqueratinas (CK, *cytokeratins*), o filamento intermedios de células epiteliales.⁶

Otras técnicas de enriquecimiento se basan en las funciones específicas de las CTCs, como la secreción de proteínas (ensayo EPISPOT) o el comportamiento invasivo en una matriz de adhesión celular (CAM, *Cell adhesión matrix*), así como por marcaje de DNA tumoral por adenovirus con proteína verde fluorescente (GFP) (Figura 4).⁶

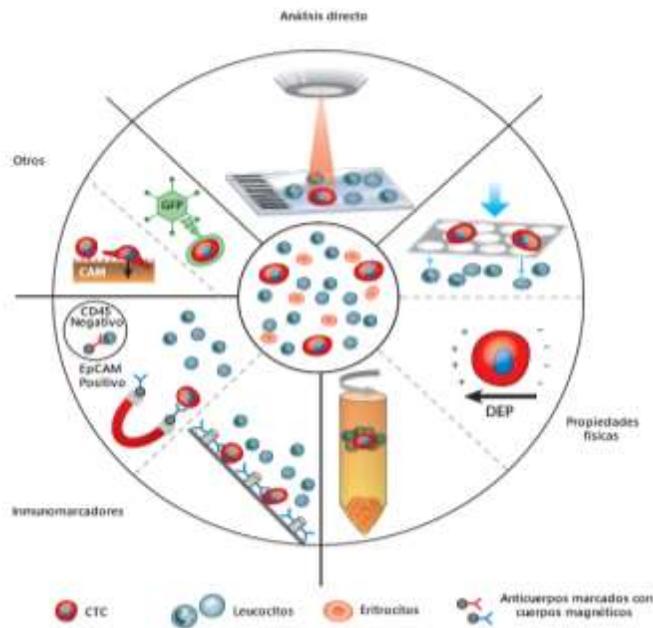


Figura 4. Técnicas de enriquecimiento de CTCs. El enriquecimiento se divide en dependiente de marcaje (inmunomarcadores) e independiente de marcaje (propiedades físicas).

(Tomada de Thiele, *et al*, 2017)⁶

3.3.2 Detección

Después del enriquecimiento, usualmente la fracción de CTCs contiene cierto número de leucocitos normales residuales, por lo que es necesario utilizar métodos que permitan distinguir a las células tumorales de las células normales de la sangre.¹⁵

El sistema CellSearch acreditado por la FDA (Administración de alimentos y medicamentos), para la detección de CTCs derivadas de cáncer de mama, colon y próstata, así como la mayoría de sistemas de detección de estas que se fundamentan en la identificación de proteínas celulares (ISET, *Isolation by Size of Epithelial/Throphoblastic Tumor cells*), cuentan con el mismo criterio de identificación: la fluorescencia característica de células que expresen citoqueratinas (CKs), con ausencia del antígeno común de leucocitos CD45, y un colorante nuclear (DAPI). A través del análisis de imagen multicolor se pueden definir a las CTCs como células CK+/CD45-/DAPI+ (Figura 5).¹⁵

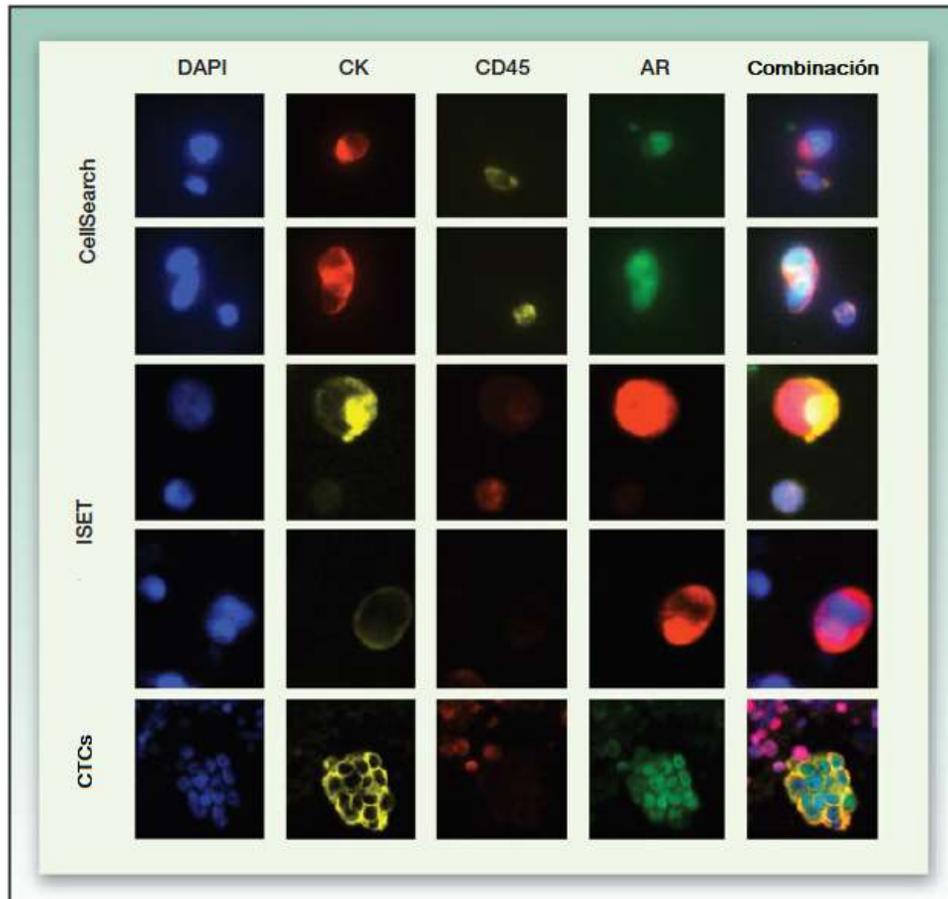


Figura 5. Detección de CTCs mediante los métodos de CellSearch e ISET. Identificación mediante inmunofluorescencia de CTCs en pacientes con cáncer de próstata. (Tomada de Yap, et al, 2014)¹⁵

Por otra parte, la detección y caracterización molecular de CTC es una de las áreas más activas de la investigación del cáncer en la actualidad. Estudios de caracterización molecular han indicado que los perfiles de expresión de las CTCs son diferentes para cada tipo de cáncer, hallazgo que denota la necesidad de identificar perfiles que aumenten el rendimiento y la detección de éstas en diferentes neoplasias. Recientemente se han desarrollado tecnologías de elevada sensibilidad que permiten la detección de CTC. Una de las técnicas ampliamente utilizadas para dicha detección es la RT-qPCR, en la cual se detectan oncogenes sobre expresados o genes específicos de tumor que originalmente no se encuentran presentes en sangre de individuos sanos (Figura 6). Diferentes clases de biomarcadores han sido utilizados para la identificación de tumores y éstos a su vez han sido aplicados para la caracterización de las CTC. En la actualidad existen diversos métodos de detección de mutaciones altamente sensibles; incluyendo hibridación fluorescente in situ (FISH), PCR alelo-específica, PCR cuantitativa, PCR digital y RT-qPCR cuantitativa en tiempo real, los cuales se utilizan para detectar variaciones genéticas en las CTC con respecto a las células de individuos sanos.¹⁴⁻¹⁶

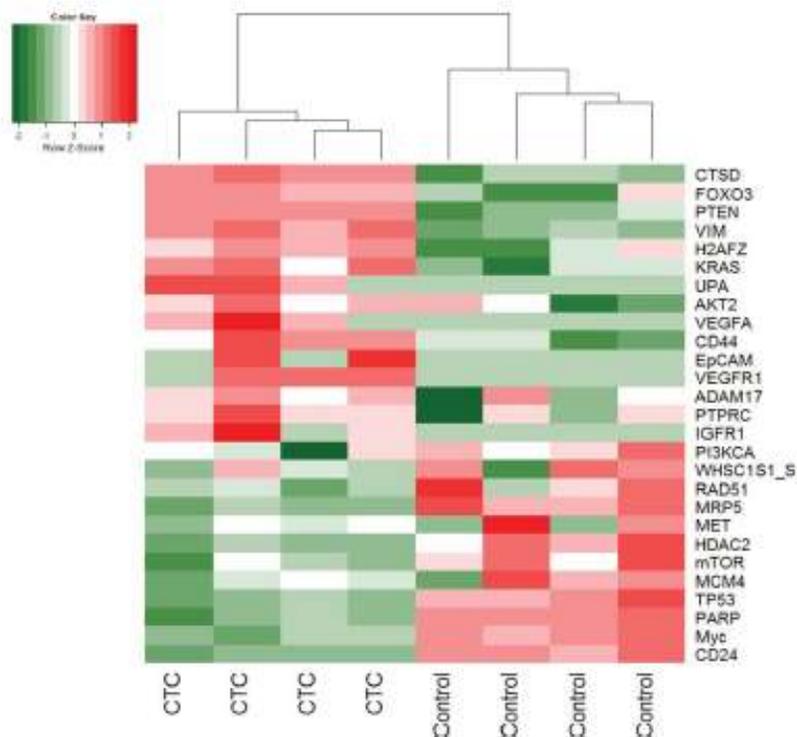


Figura 6. Patrón de expresión diferencial entre CTCs e individuos sanos. Mapa de calor con niveles de expresión de mRNA de muestras de pacientes con CTCs comparados con controles sanos. Los cuadros rojos y verdes indican niveles altos y bajos de mRNA, respectivamente (Tomada de Hensler, *et al.* 2015)¹⁶

3.3.3 Biomarcadores para la detección de CTCs

Los patrones de expresión diferencial entre las CTCs y células de individuos sanos, que modifican el fenotipo de las CTCs, son la base de la detección de éstas. Genes como KI67, BCL6, BCL10, CK19, VEGFR1, hTERT, TWIST1 y MAGE-A3, establecidos en los “Hallmarks del cáncer” e involucrados en señales de proliferación sostenida, evasión de señales supresoras de crecimiento, cambios en el metabolismo, resistencia a la apoptosis, inestabilidad genómica, inducción de angiogénesis, inmortalidad replicativa, evasión de la respuesta inmunológica, inducción de inflamación y los implicados en invasión y metástasis han resultado ser los genes distintivos entre las CTCs y las células normales (Figura 7).¹¹

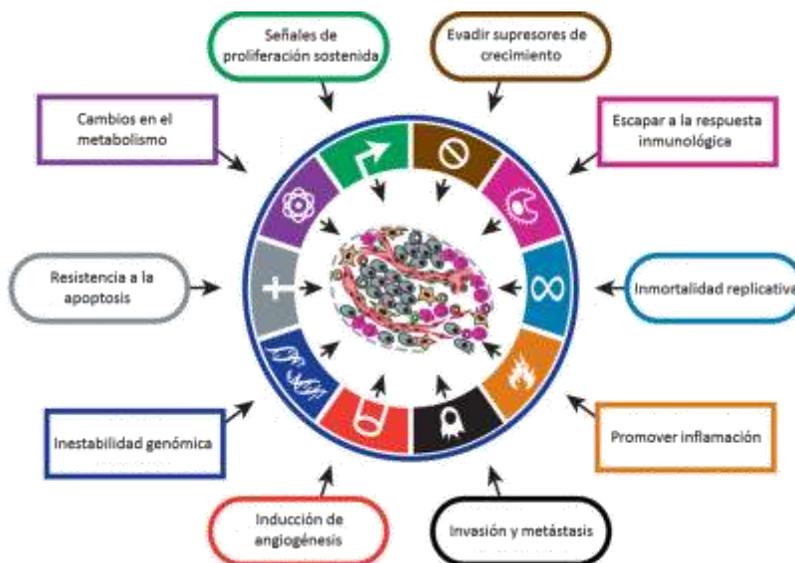


Figura 7. Características de células tumorales para la detección de CTCs. Mecanismos celulares alterados en células tumorales que permiten la diferenciación entre éstas y células sanas.

(Tomada de Hanahan y Weinberg, 2011)¹¹

3.3.3.1 Marcadores de proliferación: *KI67*

Una de las características fundamentales de las células tumorales es su capacidad de proliferación. Los tejidos normales, a diferencia de las células tumorales, controlan cuidadosamente la producción y liberación de señales promotoras del crecimiento que activan ciclos de desarrollo y división celular, asegurando así la homeostasis. Las células cancerosas al tener desreguladas estas señales, tienen un potencial de replicación ilimitado. Las señales de activación se transmiten en gran parte por factores de crecimiento que se unen a los receptores de la superficie celular que fundamentalmente contienen dominios de tirosina cinasa intracelulares. Estos últimos proceden a emitir señales a través de vías de señalización intracelular ramificada que regulan la progresión a lo largo del ciclo celular, así como el

crecimiento celular. A menudo estas señales influyen en otras propiedades biológicas de la célula, como la supervivencia celular y el metabolismo energético. Diversos biomarcadores han sido asociados a proliferación celular, entre estos se destaca *Ki67*, marcador de proliferación por excelencia.^{11,17}

El gen que codifica para la proteína nuclear *Ki67* se encuentra en el brazo largo del cromosoma 10 (10q26.2) contiene 16 exones y codifica una proteína de 395 kDa, asociada con el crecimiento y proliferación celular. Dicha proteína se encuentra en todas las fases activas del ciclo celular (G1, S, G2 y M), pero ausente en G0. Asimismo se conoce que la expresión de *Ki67* se incrementa en células tumorales en comparación con las sanas. Por tal motivo, *Ki67* es un marcador asociado con la proliferación tumoral y con un pronóstico adverso en pacientes con cáncer de vejiga, próstata y carcinoma renal, entre otros, incluido el LDCBG (Figura 8).^{11, 17,18}

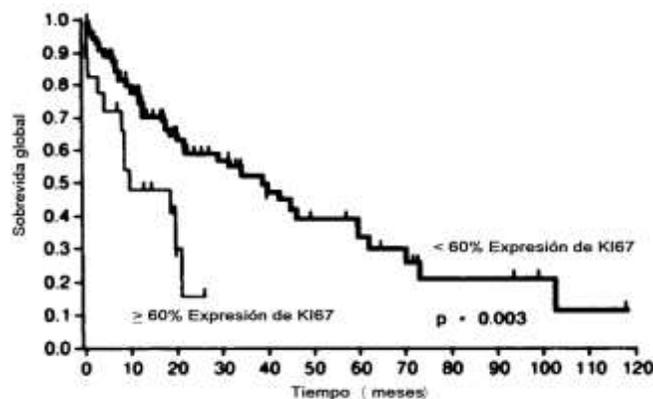


Figura 8. Expresión de Ki67 y supervivencia global de pacientes con LDCBG.

Supervivencia global reducida en pacientes con LDCBG con expresión de Ki67 en más del 60% de células neoplásicas. (Tomada de Broyde, *et al.* 2009)¹⁷

3.3.3.2 Resistencia a la apoptosis: *BCL6*, *BCL10*

Se sabe que la apoptosis es un mecanismo que impide el desarrollo de cáncer debido a la eliminación de células con potencial de formación de neoplasias malignas. Sin embargo, en cáncer se ha establecido el fenómeno de resistencia a la muerte celular, en comparación con las células normales en las que se activa la señalización de la apoptosis en respuesta a diversas situaciones de estrés celular e incluso en el transcurso de los procesos de transformación maligna. Las células tumorales desarrollan una variedad de estrategias para limitar o eludir la apoptosis. Lo más común es la pérdida de la función supresora de tumores de *TP53* que elimina este sensor de daño crítico. También, en los tumores establecidos la

apoptosis se puede ver disminuida debido al decremento de proteínas pro-apoptóticas (Bax, Bim, Puma) y al aumento de proteínas anti-apoptóticas (BCL2, BCL6).^{11, 19}

El gen que codifica para la proteína antiapoptótica BCL6 se encuentra en el brazo largo del cromosoma 3 (3q27.3), contiene 12 exones y codifica para una proteína de aproximadamente 73 kDa. El gen que codifica para la proteína BCL10 se encuentra en el brazo corto del cromosoma 1 (1p22.3), contiene 5 exones y codifica para una proteína de aproximadamente 26 kDa. En condiciones fisiológicas, estos miembros de la familia anti-apoptótica BCL2, participan en el desarrollo de células B y mantienen inhibidas proteínas antiapoptóticas, hasta ser requeridas debido al daño celular. Sin embargo, en cáncer, además de regular negativamente eventos apoptóticos, su desregulación está implicada en la supervivencia y proliferación de las células tumorales. A pesar de dichas propiedades, aún es controversial el impacto pronóstico de *BCL6* y *BCL10* en linfomas (Figura 9).^{11, 19}

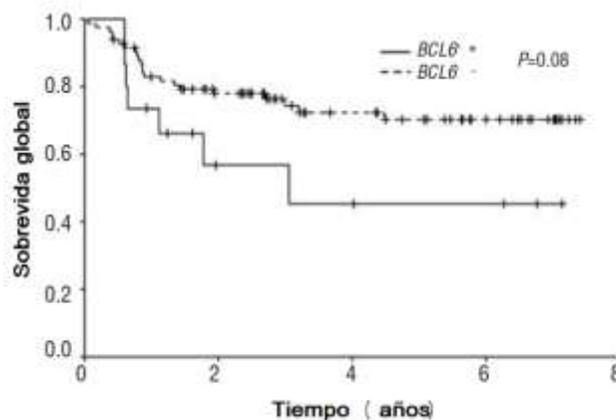


Figura 9. Expresión de BCL6 y sobrevida global de pacientes con LDCBG. Sobrevida global reducida en pacientes con LDCBG con expresión de BCL6 en células neoplásicas.

(Tomada de Shustik, et al. 2010)¹⁹

3.3.3.3 Inducción de angiogénesis: *VEGFR1*

Al igual que los tejidos normales, los tumores requieren suministro de nutrientes y oxígeno, así como eliminar los desechos del metabolismo. Por tanto, es de suma importancia la activación de la angiogénesis en las células tumorales para la proliferación tumoral, invasión y metástasis. En el adulto, la angiogénesis se puede activar de manera transitoria en procesos de cicatrización. Por el contrario, durante la progresión tumoral, un "switch angiogénico" casi siempre se activa y permanece encendido, lo que provoca que la vascularización que se

encuentra normalmente inactiva, brote continuamente de nuevos vasos que ayudan a mantener el crecimiento del tumor. Algunos de los reguladores angiogénicos son proteínas de señalización que se unen a receptores celulares expresados en la superficie de células endoteliales vasculares. Los prototipos bien conocidos de inductores de la angiogénesis son el factor de crecimiento endotelial vascular-A (VEGF-A) y sus receptores (VEGFR1/2), los cuales se han asociado con la vascularización de tumores y con cánceres metastásicos.^{11,20}

El gen que codifica para el receptor *VEGFR1* se encuentra en el brazo largo del cromosoma 13 (13q12.3), contiene 33 exones y codifica para una proteína de aproximadamente 150 kDa. Este receptor pertenece a una familia de factores angiogénicos que se encuentran frecuentemente activos en los procesos de reparación de tejidos asociado a daños o a infecciones. En cáncer se ha descrito que además de estar implicados en la vascularización de tumores para su proliferación, se encuentran asociados en la actividad metastásica de diversos tipos de cáncer, asignándole a su expresión un impacto pronóstico adverso.^{11, 20}

En LDCBG se ha relacionado la expresión VEGF-A y de VEGFR1/2 con mal pronóstico, al asociar su presencia con un curso clínico agresivo, tanto en LDCBG del Centro Germinal (CG) como de Célula B Activada (CBA) (Figura 10).²¹

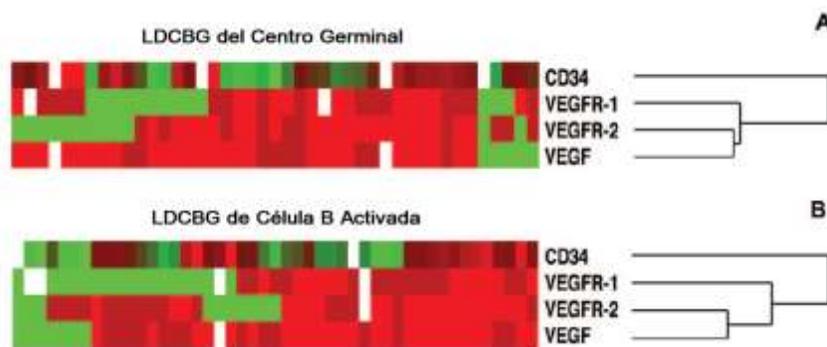


Figura 10. Expresión de VEGF-A y VEGFR 1/2 en LDCBG. Mapa de calor con niveles de expresión de *VEGF*, *VEGFR1/2*. Los cuadros rojos y verdes indican niveles altos y bajos de mRNA, respectivamente (Tomada de Gratzinger, *et al.* 2007)²¹

3.3.3.4 Invasión y metástasis: *CK19*, *TWIST1*

La diseminación de células malignas a partir del tumor primario y la subsecuente colonización de otros tejidos en sitios distales o cercanos comprenden procesos secuenciales conocidos como cascada metastásica. La secuencia de eventos incluye la invasión local por parte de las células tumorales, intravasación de células de tumor primario a la circulación, arresto y extravasación a parénquima de otros tejidos, formación de micrometástasis y colonización terminal. Dichos procesos son dirigidos por dos eventos importantes: la transformación

epitelio-mesenquimal y la degradación de matriz extracelular tumoral. La transformación epitelio-mesenquimal (EMT) proporciona a las células la habilidad de resistencia a la apoptosis e invasión, ésta es activada principalmente por factores de transcripción como *TWIST1*. El gen que codifica para la expresión de *TWIST1* se encuentra en el brazo corto del cromosoma 7 (7p21.1), contiene 4 exones y a partir de este se sintetiza una proteína de aproximadamente 21 kDa. A su vez, la degradación de la matriz extracelular (ECM) es de suma importancia para la liberación de células del tumor primario, ésta es llevada a cabo por metaloproteasas y citoqueratinas como la *CK19*. El gen que codifica para dicha citoqueratina se encuentra en el brazo largo del cromosoma 17 (17q21.2), contiene 6 exones y codifica una proteína de aproximadamente 44 kDa. Marcadores tanto de EMT como de degradación de ECM han sido identificados en casos de cáncer metastásico, y se han asociado con un pronóstico adverso en pacientes que los expresan.^{11,14,22}

3.3.3.5 Inmortalidad replicativa: *hTERT*

Otra característica que requieren las células tumorales para poder establecer tumores macroscópicos y metástasis, es un potencial replicativo ilimitado. Esta capacidad está en marcado contraste con el comportamiento de las células normales en el cuerpo que son capaces de cursar solo un número limitado de ciclos sucesivos de crecimiento y división celular. Esto debido al envejecimiento celular que consiste en el acortamiento de telómeros de los cromosomas, fenómeno que es detectado como daño al DNA, desencadenando sistemas de reparación, mediados por *P53*, que induce los estados de senescencia o apoptosis. En diversas ocasiones, las células tumorales exhiben un potencial replicativo ilimitado, denominado “inmortalización”, que consiste en evitar el acortamiento de los telómeros y en consecuencia se desencadena un potencial de proliferación descontrolado. Por lo tanto, la activación anormal de telomerasas, como *hTERT*, está directamente asociada a procesos oncogénicos.^{11,23}

El gen que codifica para la telomerasa *hTERT* se encuentra en el brazo corto del cromosoma 5 (5p15.33), el cual contiene 16 exones y codifica para una proteína de 127 kDa con actividad de transcriptasa reversa. Asimismo, ésta se encuentra silenciada en células somáticas y activa en células germinales y en aproximadamente 90% de los tipos de cáncer humano. Recientemente se ha descrito que además del mantenimiento de los telómeros, *hTERT* está involucrada en la regulación de la expresión de genes, en proliferación celular, apoptosis, adhesión celular, migración y en transición epitelio-mesenquimal (EMT). En diversos tipos de cáncer, como el de gástrico, se ha asociado su expresión con los casos de cáncer invasivo y con una sobrevida global reducida.²³

En linfomas se han descrito los niveles de expresión y actividad de *hTERT*. En Linfoma de Células del Manto (LCLM), Linfoma Folicular (LF), LDCBG y Linfoma de Burkitt, se encontró asociación con la expresión de *MYC* (Figura 11).²⁴

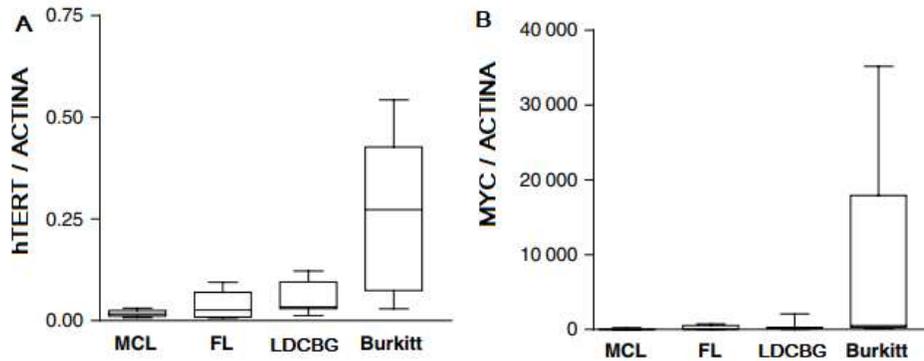


Figura 11. Niveles de expresión de A) *hTERT* y B) *MYC* en LNH.

El nivel de expresión de *hTERT* en los linfomas es similar al de *MYC* (Tomado de Klapper, *et al.* 2003)²⁴

3.3.3.6 Inestabilidad genómica: *MAGE-A3*

Las alteraciones genéticas y epigenéticas que sufre el genoma de las células neoplásicas se han podido detectar a través de las técnicas de biología molecular, como la secuenciación de DNA de alta resolución. Estas alteraciones confieren a las células transformadas ventajas en la proliferación y supervivencia en comparación de las células normales, se heredan de generación en generación mientras ocurre la progresión tumoral, manteniendo clonas fenotípicamente malignas. Dichas alteraciones pueden ser las causantes de la inactivación de genes supresores de tumor (*P53*) o la activación de genes implicados en proliferación (*MYC*), debido a cambios directos en el DNA o por mecanismos epigenéticos de silenciamiento/activación de genes. Un ejemplo son los Antígenos Testiculares de Cáncer (CTA, *Cancer Testis Antigens*), que están ausentes en células somáticas normales y presentes en células germinales y en diversos tumores de diferentes orígenes histológicos (Figura 12). Los CTA son considerados en la actualidad como marcadores de mal pronóstico, pues su expresión se ha asociado a sobrevida global corta en pacientes que los expresan. En total se han reportado 140 transcritos de estos CTAs en diferentes tumores. Sin embargo, uno de los más estudiados es el *MAGE-A3* (Melanoma Antigen-A3).^{25,26}

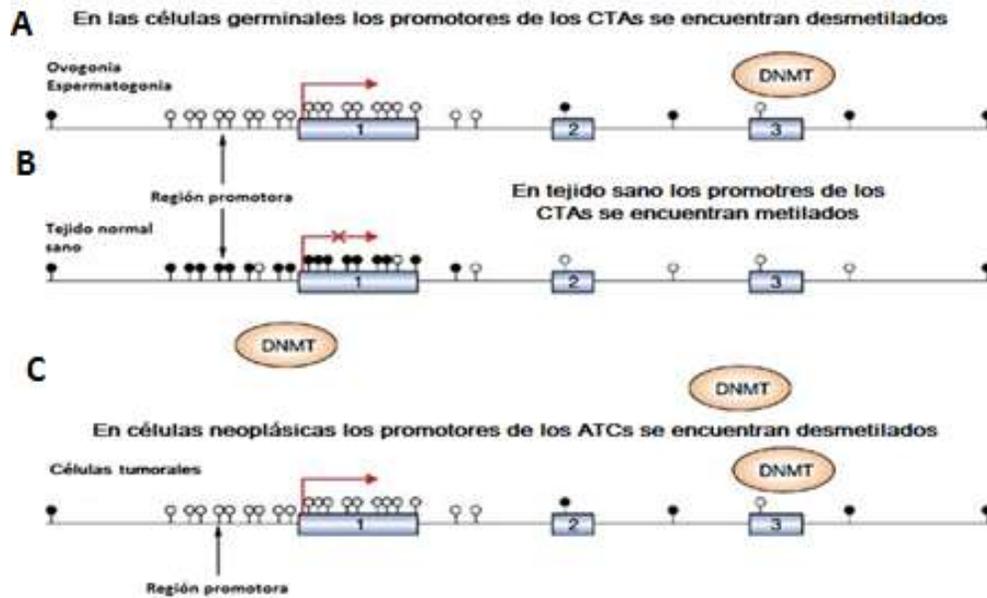


Figura 12. Control de expresión de los CTAs en A) células germinales, B) somáticas y C) neoplásicas. Patrones de metilación de promotores de CTAs en células sanas y tumorales. (Tomada y modificada de Baylin; 2005)²⁶

El gen que codifica para el CTA *MAGE-A3* se encuentra en el brazo largo del cromosoma X (Xq28), contiene 6 exones y codifica para una proteína de aproximadamente 35 kDa. Algunas de las funciones que han sido descritas para este miembro de la familia *MAGE* son su implicación en la supervivencia de las células neoplásicas, actuando como supresor de *P53*, al favorecer la unión con su correpresor Kap-1. Adicionalmente, se ha demostrado que *MAGE-A3* bloquea directamente la interacción de *P53* con la cromatina, inhibiendo el efecto de regulador transcripcional de *P53* y también regula negativamente la función de éste mediante el reclutamiento de represores de la transcripción como histonas desacetilasas (HDAC). Adicionalmente se ha identificado a *MAGE-A3* como regulador de las ubiquitin ligasas de E3, que facilitan la degradación de proteínas como *P53*. En LDCBG se ha encontrado correlación entre su expresión y la progresión de la enfermedad, así como con una supervivencia global reducida en pacientes que lo expresan (Figura 13).²⁵⁻²⁷

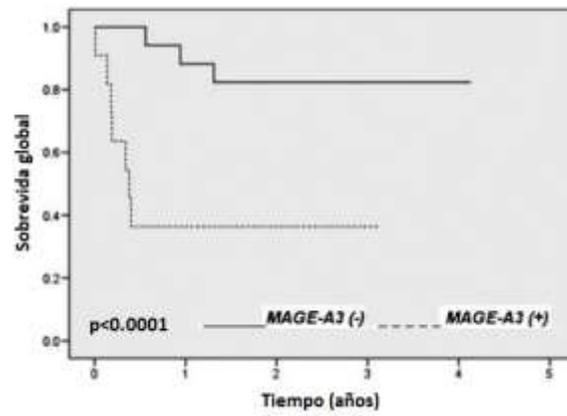


Figura 13. Expresión de *MAGE-A3* y sobrevida global de pacientes con LDCBG. Sobrevida global reducida en pacientes con LDCBG con expresión de *MAGE-A3* células neoplásicas. (Tomada de Olarte, *et al.* 2011)²⁷

3.4 Linfoma Difuso de Células B Grandes

El Linfoma Difuso de Células B Grandes (LDCBG) es una neoplasia de células B maduras, que se caracterizan por ser células de tamaño grande. Éstas tienen un núcleo dos veces más grande que el de un linfocito maduro normal, con nucléolos vesiculares prominentes, citoplasma basófilo, con alta tasa de proliferación y con un patrón de crecimiento difuso (Figura 14).^{34,35}

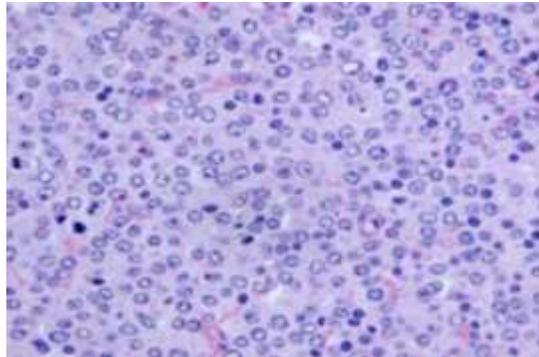


Figura 14. Morfología de linfoma difuso de células B grandes.

Tinción de corte histológico de caso de LDCBG. (Tomado de Hatton, *et al.* 2014)³⁴

3.4.1 Clasificación

La clasificación actual del LDCBG se encuentra en la revisión realizada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para la Clasificación de Tumores de los Tejidos Hematopoyéticos y Linfoides de 2017, en donde se ubica en la categoría de Neoplasias de Células B Maduras. A su vez, el desarrollo de diversos estudios ha ayudado a la descripción de subtipos morfológicos, biológicos y clínicos (Tabla 1).^{34,35}

Tabla 1. Clasificación del linfoma difuso de células B grandes. (Tomada de Swerdlow, *et al* 2017)

Linfoma Difuso de Células B Grandes

- Variantes morfológicas
 - Centroblástico
 - Inmunoblástico
 - Anaplástico
 - Otras variantes raras
- Subgrupos moleculares
 - Centro Germinal (CG, *Germinal Center*)
 - Célula B Activada (ABC, *Activated B Cell*)

Otros linfomas de células B Grandes

- Linfoma de células B Grandes rico en Células T/Histiocitos
- Linfoma difuso de células B grandes primario de SNC
- Linfoma difuso de células B grandes primario cutáneo
- Linfoma difuso de células B grandes EBV-positivo
- Linfoma difuso de células B grandes asociado con inflamación crónica
- Granulomatosis linfomatoide
- Linfoma de células B grandes con rearrreglos de IRF4
- Linfoma de células B grandes primario mediastinal (tímico)
- Linfoma de células B grandes intravascular
- Linfoma de células B grandes ALK-positivo
- Linfoma plasmablástico
- Linfoma difuso de células B grandes HHV8-positivo
- Linfoma de efusión primaria

Linfoma de células B de alto grado

- Linfoma de células B de alto grado con rearrreglos de MYC y BCL2 y/o *BCL6*
- Linfoma de células B de alto grado

Linfoma de células B inclasificable

- Linfoma de células B inclasificable, con características intermedias entre Linfoma Difuso de Células B Grandes y Linfoma de Hodgkin Clásico

3.4.2 Epidemiología

El LDCBG constituye del 25 al 40% de los Linfomas No Hodgkin (LNH) a nivel mundial. La edad de presentación de esta patología es en la vejez. Es más frecuente en la séptima década de la vida, pero puede ocurrir en adultos jóvenes y raramente en la infancia. Es ligeramente más común en hombres que en mujeres.^{35,36}

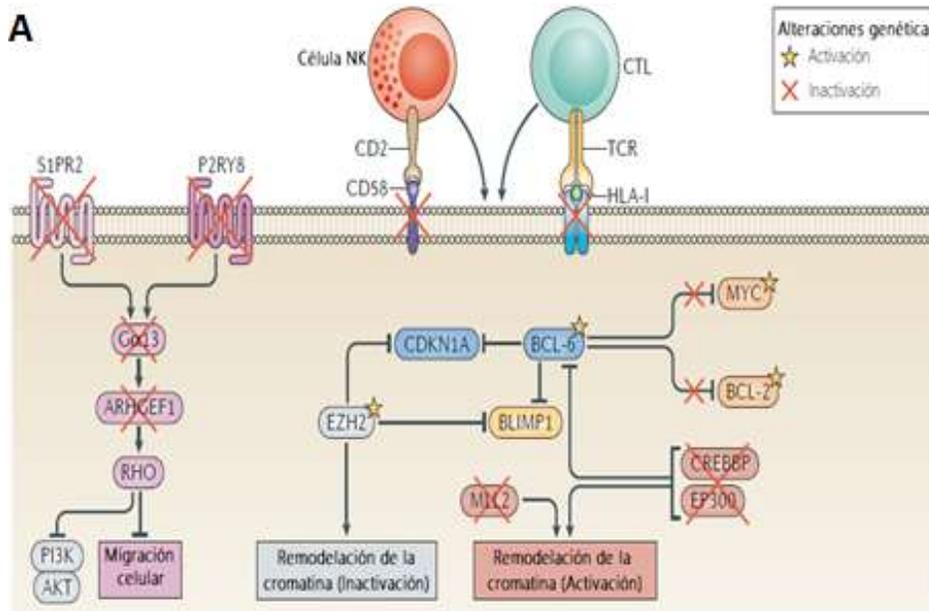
En México, el LDCBG constituye alrededor del 48% del total de los linfomas. De acuerdo al SEER (*Surveillance, Epidemiology, and End Results*), se calcula una incidencia anual de 23.500 nuevos casos a nivel mundial. Su incidencia aumenta gradualmente a partir de la quinta década de edad.³⁷

3.4.3 Etiología

La etiología del LDCBG es desconocida. Este tipo de tumores generalmente se presentan *de novo* (primario) pero pueden presentarse también debido a una transformación de un linfoma menos agresivo (secundario), como el linfoma de linfocitos pequeños, folicular, de la zona

marginal, o Linfoma Hodgkin con predominio de linfocitos. Un factor de riesgo significativo son las inmunodeficiencias, como la mononucleosis infecciosa producida por el Virus de Epstein Barr (EBV).³⁸

En la actualidad, numerosos estudios de secuenciación genómica han identificado las principales anomalías genéticas y epigenéticas involucradas en la alteración de diversos procesos celulares y por tanto en la iniciación de linfomagénesis (Figura 16). Dentro de estos destacan, alteraciones en modificadores de la cromatina (metilación y acetilación), como la inactivación de las acetil transferasas EP300, CREBBP, así como la actividad aberrante de las proteínas con actividad de histona metil transferasa MLL2 y EZH2; la desregulación de crecimiento celular, proliferación y metabolismo mediado por MYC; la desregulación de *BCL6*, involucrada en la resistencia a la apoptosis y en la respuesta a daño al DNA; la activación constitutiva de NF- κ B a través de la activación anormal de CD79A/B, CARD11, MYD88; alteraciones en la vía de señalización de BCR y TLRs; inducción de angiogénesis aberrante por la expresión de VEGF-A, *VEGFR1/2*; el bloqueo en la diferenciación celular terminal mediada por BLIMP1 (*B Lymphocyte-Induced Maturation Protein 1*); y la inactivación de genes involucrados en el escape inmunológico, como la ausencia de moléculas de Clase I del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC-I) (Figura 15).^{39,40}



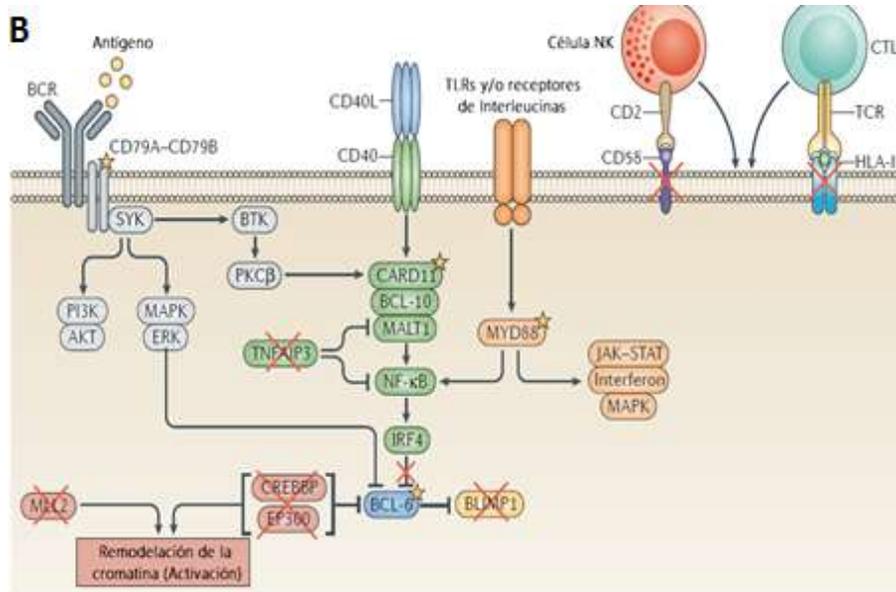


Figura 15. Vías afectadas durante linfomagénesis en LDCBG A) Del Centro Germinal y B) Célula B Activada. (Tomada y modificada de Basso & Dalla-Favera, 2015)⁴⁰

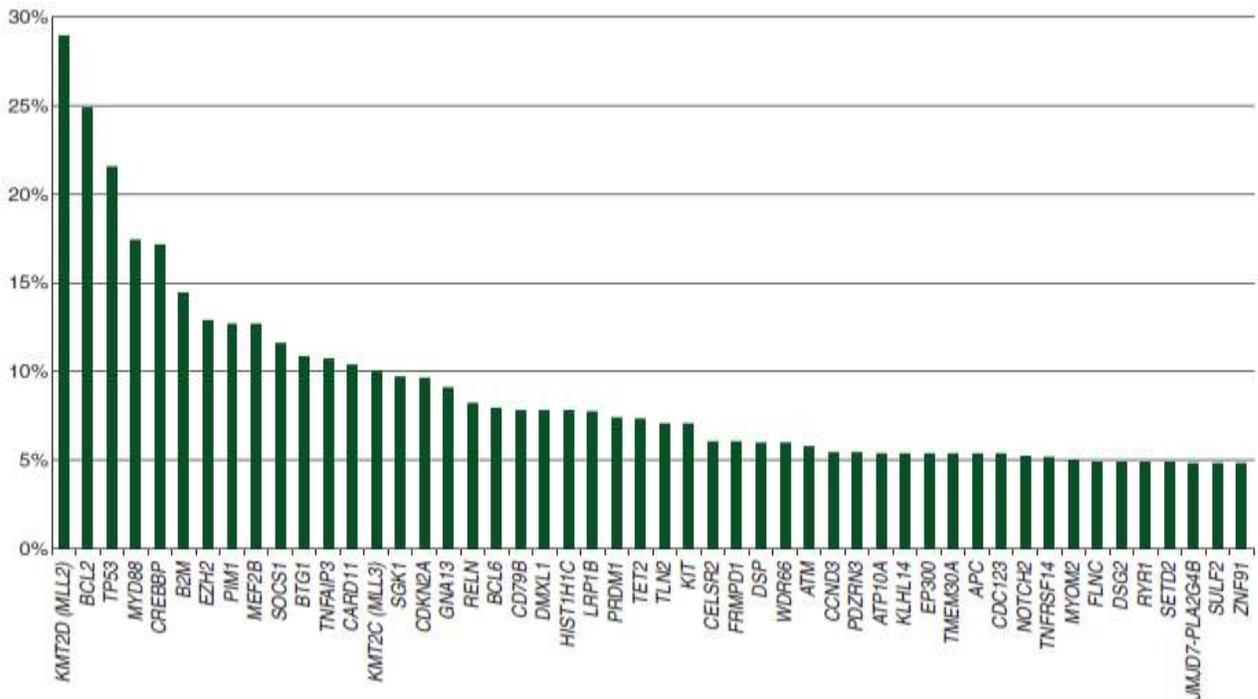


Figura 16. 50 principales genes mutados en LDCBG. Mutaciones registradas en la base de datos del Catálogo de Mutaciones Somáticas en Cáncer. (Tomado de Testoni, *et al.* 2015)³⁹

3.4.4 Diagnóstico

Para llevar a cabo el diagnóstico de LDCBG se realiza un estudio histopatológico de una muestra de ganglio linfático y un estudio de inmunohistoquímica, además de los exámenes de laboratorio, como biometría hemática, química sanguínea, lactato deshidrogenasa (LDH) y B2-microglobulina. Se realiza también aspirado de médula ósea, para descartar infiltraciones; y pruebas de gabinete como TAC (Tomografía Axial Computarizada) o PET (*Positron Emission Tomography*), para determinar sitios de afectación, establecer el estadio clínico y para realizar el seguimiento de los pacientes.³⁴

3.4.5 Hallazgos clínicos

El LDCBG se presenta clínicamente como un linfoma agresivo. Evolucionan en pocos meses evidenciando inmediatamente los síntomas característicos (síntomas B), que comprenden fiebre, sudoración nocturna (diaforesis) y pérdida de peso. Además se presentan síntomas relacionados a los órganos infiltrados por el tumor, que resultan fatales si no se tratan a tiempo. En la mayoría de los casos los niveles séricos de LDH y de β 2-microglobulina se encuentran por arriba de los valores normales. Debido a la mitosis descontrolada, los pacientes frecuentemente presentan masas tumorales voluminosas en uno o más ganglios linfáticos (adenomegalias) o en sitios extranodales. Virtualmente, cualquier tejido u órgano puede ser el sitio del desarrollo primario del LDCBG. Su rápida progresión es la causante de que el 60% de los pacientes sean diagnosticados en estadios III o IV. En la actualidad, el estadio clínico de los pacientes (extensión del linfoma) se determina por medio del PET, que evidencia los sitios infiltrados por el tumor, pudiendo así establecer el estadio clínico del paciente de acuerdo a la localización tumoral.⁴¹⁻⁴³

3.4.6 Tratamiento

La opción terapéutica estándar para el tratamiento del LDCBG consta del esquema de quimioterapia **R-CHOP** que incluye **Ciclofosfamida**, **Hidroxicarbocina** (doxorubicina), **Oncovin** (vincristina), **Prednisona** y el anticuerpo monoclonal anti-CD20, **Rituximab**, constituyendo el esquema de primera línea. El número promedio de ciclos de quimioterapia administrados es de 6, dosificados a lo largo de 126 días, en intervalos de 21 días (Tabla 2).⁴⁴⁻

45

Tabla 2. Esquema de tratamiento de LDCBG. (Tomada de Lichtman, *et al.* 2014)⁴⁴

R-CHOP	DOSIS	VÍA DE ADMINISTRACIÓN	DÍAS DE TRATAMIENTO	INTERVALO ENTRE CICLOS (DÍAS)	CICLOS
Rituximab	375 mg/m ²	Intravenosa	1		
Ciclofosfamida	750 mg/m ²	Intravenosa	1		
Doxorrubicina	50 mg/m ²	Intravenosa	1	21	6 a 8
Vincristina	1.4 mg/m ²	Intravenosa	1		
Prednisona	100 mg/día	Oral	1 a 5		

Diversos estudios han demostrado que las tasas de respuestas completas posterior al tratamiento con R-CHOP están por arriba del 50% (Tabla 3).⁴⁵

Tabla 3. Tasa de respuesta al tratamiento con R-CHOP.

(Tomada y modificada de Coiffier, *et al.*; 2002)⁴⁵

Tipo de respuesta	R-CHOP (%)
Respuesta completa	52
Respuesta completa sin confirmar	23
Respuesta parcial	7
Enfermedad estable	1
Enfermedad progresiva	9
Muerte	6
Efectos tóxicos del tratamiento	1

3.4.7 Factores pronósticos

La determinación de factores pronósticos proporciona un método de evaluación del probable desarrollo de la neoplasia. En LDCBG, una vez efectuado el diagnóstico se procede a estratificar a los pacientes de acuerdo a: los hallazgos clínicos, que conforman el Índice Pronóstico Internacional (IPI) y el IPI Revisado (R-IPI), así como la presencia de sitios extranodales, marcadores inmunohistoquímicos y rearrreglos cromosómicos, con los cuales, el hematólogo estratifica al paciente y toma decisiones terapéuticas³⁴

3.4.7.1 Clínicos

En 1994 se estableció el IPI como la primera herramienta clínica usada para estratificar y predecir el comportamiento de los pacientes con LDCBG, basado en la presencia/ausencia de cinco variables clínicas al diagnóstico: 1) edad, pacientes mayores de 60 años; 2) estado funcional ECOG, Eastern Cooperative Oncology Group (0 – 1 *versus* 2 – 4), 3) niveles séricos de LDH (arriba del rango normal), 4) cantidad de sitios extranodales (0 – 1 *versus* 2 o más), y 5) el estadio clínico (I – II *versus* III-IV), en donde cada variable equivale a un punto. De acuerdo al puntaje obtenido, los pacientes pueden ser estratificados en cuatro grupos: 1) bajo (0 o 1 puntos), 2) intermedio bajo (2 puntos), 3) intermedio alto (3 puntos), y 4) alto (4 o 5 puntos). Actualmente, con la adición de Rituximab al esquema de tratamiento, se ha definido

un IPI revisado (R-IPI), en donde, de acuerdo al tratamiento con R-CHOP y con base al número de factores de riesgo presentados al diagnóstico, hay una re-distribución de los pacientes en tres grupos simplificados, resultando un nuevo modelo predictivo, que usa las mismas cinco variables al diagnóstico (Figura 17).⁴⁶

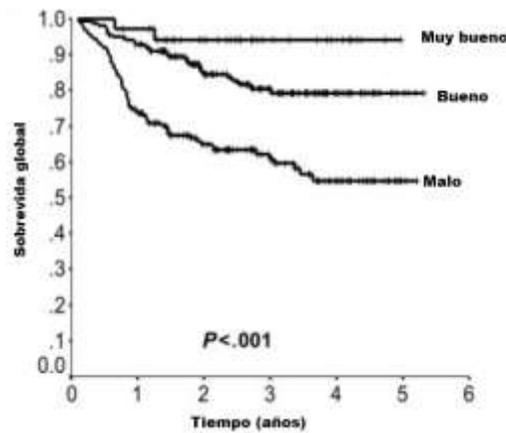


Figura 17. Supervivencia global de acuerdo al índice pronóstico internacional - revisado. Desenlace clínico de acuerdo al R-IPI (Tomada y modificada de Sehn, et al. 2007)⁴⁶

Sehn y colaboradores en 2007, determinaron la supervivencia según el IPI y el R-IPI para cada uno de los grupos de riesgo en 365 pacientes, los resultados se resumen en la Tabla 4.

Tabla 4. Desenlace de acuerdo al R-IPI en pacientes tratados con R-CHOP.

(Tomada de Sehn, et al, 2007)⁴⁶

Grupo de riesgo	No. factores de riesgo	% Pacientes
R-IPI		
Muy bueno	0	10
Bueno	1, 2	45
Malo	3, 4, 5	45

3.4.7.2 Sitios extranodales

Se sabe que la presencia de más de un sitio extranodal en el LNH funge como factor pronóstico adverso según el IPI. Aunque el pronóstico del LDCBG mejora con la adición de Rituximab, las afectaciones extraganglionares se siguen considerando como un factor pronóstico adverso por el R-IPI. La frecuencia de pacientes con LDCBG con infiltración de sitios extranodales comprende, de acuerdo a diversos estudios, entre 31.6% y hasta 67.9% del total de los pacientes. Se han descrito hasta 26 diferentes sitios anatómicos extranodales que pueden hallarse infiltrados en pacientes con LDCBG, dentro de los que destacan: el tracto

gastrointestinal, cabeza y cuello, piel y tejidos blandos, el tracto genitourinario, huesos, sistema respiratorio, médula ósea, hígado, páncreas, glándula tiroidea y mamaria.^{47,48}

Por otra parte, la supervivencia global a 5 años de pacientes con LDCBG con 1 o más sitios extranodales infiltrados es menor (54.3%), en comparación con las pacientes que no presentan infiltraciones extraganglionares (80.2%).^{47,48}

Asimismo, se han identificado 8 sitios anatómicos con relevancia pronóstica, de los cuales solo 1 es asociado a un pronóstico favorable (anillo de Waldeyer), y los 7 restantes son asociados a un pronóstico desfavorable (pleura, intestino delgado, peritoneo, glándulas adrenales, testículos, médula ósea y sangre periférica), rutinariamente se utiliza el PET para la determinación de infiltración maligna en dichos sitios anatómicos.^{47,48}

3.4.7.3 Inmunológicos

El uso de métodos inmunohistoquímicos como parte del diagnóstico de rutina ha sido esencial en el estudio de los linfomas, ya que se han identificado marcadores que permiten reconocer dos subtipos biológicos de LDCBG con diferente valor pronóstico. Se ha demostrado que el subtipo con el perfil de expresión del Centro Germinal (CG) tiene una mejor Supervivencia Global (SG) y Supervivencia Libre de Eventos (SLE) a 3 años, en comparación con el subgrupo con perfil de expresión de Célula B Activada (CBA), 75% vs 40% posterior al tratamiento con el esquema R-CHOP (Figura 18).^{49,50}

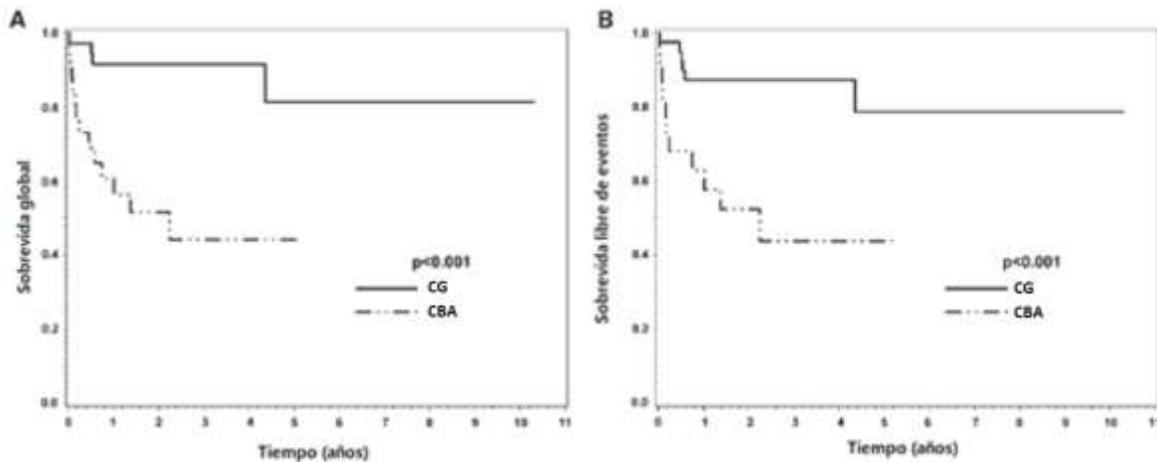


Figura 18. A) Supervivencia global y B) Supervivencia libre de eventos de acuerdo al subtipo de LDCBG. SG y SLE menores en CG vs CBA. CG: Centro Germinal; CBA: Célula B Activada (Tomada y modificada de Choi, *et al.* 2009)⁵⁰

Los biomarcadores utilizados para la diferenciación de ambos subgrupos de LDCBG, de acuerdo al criterio de Hans (utilizado en el Hospital General de México), comprenden el análisis de CD10, *BCL6* y MUM1, siguiendo el algoritmo mostrado en la Figura 19.⁵¹

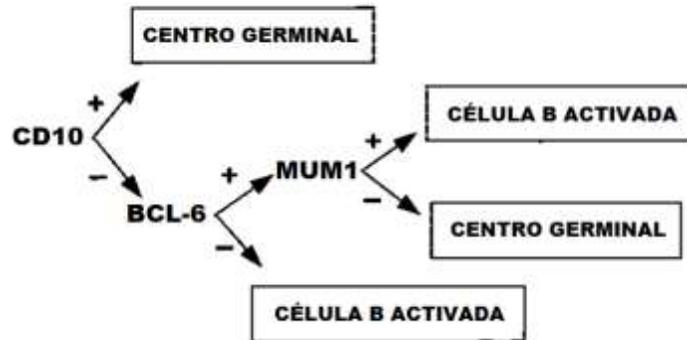


Figura 19. Algoritmo de Hans para subclasificación histológica del LDCBG. Proteínas determinadas para subclasificación de CG o CBA. (Tomada y modificada de Hans, et al, 2004)⁵¹

La frecuencia en que se presentan los subtipos del CG y de CBA corresponden a 60 y 40%, respectivamente, variando de acuerdo a la localización geográfica, edad y al algoritmo utilizado para la diferenciación.⁵²

3.4.7.4 Rearreglos cromosómicos

A pesar de los avances en la caracterización molecular del LDCBG, los marcadores pronósticos que se utilizan en la actualidad están limitados a la determinación de rearrreglos cromosómicos que involucran a los genes *MYC*, *BCL2* y *BCL6* mediante la técnica de FISH. En la actualidad se han caracterizado dos principales rearrreglos cromosómicos relacionados con pronósticos desfavorables, rearrreglos en *BCL2/BCL6* y en *MYC*. Se ha descrito en diversos estudios, que el rearrreglo del gen *MYC* (8q24) (*MYC-R*, *MYC rearrangement*), involucrado en la proliferación celular; comprende una incidencia de alrededor del 14%^{53,54} del total de los casos de LDCBG, y se ha descrito que su presencia tiene significancia pronóstica adversa, observando una asociación entre la presencia de *MYC-R* y una supervivencia global menor.^{55,56}

El impacto pronóstico de las translocaciones cromosómicas que involucran a los genes *BCL2* y *BCL6* es controversial. El oncogen antiapoptótico *BCL2* (18q21) se encuentra frecuentemente desregulado en LDCBG. La translocación t(14;18)(q32;q21) da como resultado la yuxtaposición del gen *BCL2* con la región enhancer del gen *IGHV* (Immunoglobulin heavy chain), originando la expresión alterada de *BCL2*.⁵⁷ Dicho rearrreglo se encuentra presente en un 20 a 45% de los pacientes con LDCBG y se observa predominantemente en el

subtipo del CG.^{57,58} Algunos grupos de investigación lo han considerado como factor pronóstico adverso en este subtipo de linfoma, mostrando que pacientes con la translocación t(14;18)(q32;q21) muestran una mayor incidencia de recaídas⁵⁹, disminución de la respuesta al tratamiento⁶⁰ o una SG y SLE reducidas.^{18,53} En cuanto a *BCL6*, este controla diferentes funciones celulares, incluida la respuesta al daño a DNA, la progresión del ciclo celular y la transducción de señales. *BCL6* (3q27) se encuentra frecuentemente afectado por translocaciones cromosómicas, ocurriendo con mayor frecuencia en el subtipo de CBA que en el del CG, representando el 25% de los casos de LDCBG del subtipo de ABC y el 45% del total de los casos.^{19,39} En diversos estudios se ha asociado el rearrreglo de *BCL6* con un pronóstico adverso, al estar en mayor proporción en LDCGB de ABC que en el GC. Por otra parte, se ha mostrado asociación entre la presencia de rearrreglos de *BCL6* y un IPI alto, así como con una menor supervivencia global en pacientes tratados con R-CHOP.¹⁹ Por otra parte, del 5 al 10% de los pacientes con LDCBG son casos de Linfoma Doble Hit (DHL, *Double-Hit Lymphoma*), que es definido como la presencia de *MYC*-R y translocaciones en *BCL2* o *BCL6*.^{55, 61} Casos con *MYC*-R, y rearrreglos de *BCL2* y *BCL6* son conocidos como Linfoma Triple Hit (THL, *Triple Hit Lymphoma*), de los cuales, al ser muy raros (<5% del total de los LDCBG), solo existen publicaciones aisladas y con pocos pacientes reportados, describiéndolo como un linfoma de muy mal pronóstico.⁶²

En la actualidad, la determinación de factores pronósticos en LDCBG está fundamentada en hallazgos clínicos, inmunológicos y citogenéticos. Al mismo tiempo, los trabajos nacionales e internacionales en los que se estudien marcadores moleculares y la aplicación de estos para la detección de CTCs (determinados por medio de técnicas de elevada sensibilidad y especificidad como la RT-qPCR) son escasos. A sabiendas de la importancia de la identificación de CTCs que incluye: la comprensión del desarrollo de metástasis en pacientes con cáncer²⁸, la implementación de nuevas escalas pronósticas²⁹, la estimación del riesgo de recaída³⁰, la estratificación³¹ y monitoreo en tiempo real de terapias³², la identificación de blancos terapéuticos³³, así como los mecanismos de resistencia tumoral¹⁴ y que en diversos tipos de cáncer como el de mama, pulmón, gástrico, colon, la investigación en la detección de CTCs es un hecho y constituye una importante herramienta en el estudio de estos pacientes. Es por ello que surge la necesidad de conocer el perfil de expresión de genes implicados en proliferación, resistencia a la apoptosis, degradación de matriz extracelular, inducción de angiogénesis, invasión y metástasis, inmortalidad replicativa e inestabilidad genómica, en pacientes mexicanos con LDCBG, y determinar si pueden ser biomarcadores moleculares de pronóstico en estas neoplasias, factores importantes para la realización del presente estudio.

4. JUSTIFICACIÓN

El linfoma es la neoplasia onco-hematológica más frecuente a nivel mundial, siendo el LDCBG el de mayor incidencia. Debido a su curso agresivo, solo el 50% de los pacientes alcanzan una respuesta completa posterior al tratamiento. Su gran capacidad invasiva es causante de que más del 40% de los casos se diagnostiquen en estadios avanzados (III y IV); es decir, que los pacientes presenten infiltración en uno o más órganos extranodales debido a la migración de CTCs, desde el tumor primario hacia sitios secundarios mediante el sistema circulatorio. En diversas neoplasias se ha descrito que las CTCs tienen un alto valor pronóstico, sin embargo, los estudios han sido escasos en LDCBG. Por tal motivo, surge la necesidad de evaluar un panel de genes con los que se puedan identificar CTCs en Sangre Periférica (SP), mediante la evaluación de un panel de marcadores moleculares que incluye oncogenes y genes específicos de tumor. Estos pueden ser utilizados no solo en la determinación de procesos metastásicos, sino también en la implementación de nuevas escalas pronósticas, en el monitoreo de la eficiencia de la terapia y en la evolución de la enfermedad.

5. HIPÓTESIS

Si se detectan en sangre periférica niveles de expresión elevada de los biomarcadores metastásicos *KI67*, *BCL6*, *BCL10*, *CK19*, *VEGFR1*, *TWIST1*, *hTERT* y *MAGE-A3* en Células Tumorales Circulantes de pacientes con LDCBG en cualquier etapa del tratamiento, entonces estos tendrán un comportamiento clínico desfavorable, reflejado en una menor sobrevida

6. OBJETIVOS

General

Determinar los niveles de expresión de biomarcadores metastásicos en células tumorales circulantes de sangre periférica de pacientes con LDCBG *de novo* y en cualquier etapa del tratamiento, para establecer su impacto en el comportamiento clínico de estos.

Particulares

Analizar los niveles de expresión de los biomarcadores *Ki67*, *BCL6*, *BCL10*, *CK19*, *VEGFR1*, *TWIST1*, *hTERT* y *MAGE-A3* mediante RT-qPCR en CTCs de sangre periférica de pacientes con LDCBG.

Establecer el patrón de expresión del panel de biomarcadores metastásicos en células mononucleares de individuos sanos y compararlo con el de las muestras de pacientes con LDCBG.

Definir si existe asociación entre la sobre expresión de los biomarcadores metastásicos y los parámetros clínicos de los pacientes.

Realizar un análisis de sobrevida de los pacientes en relación a la sobre expresión del panel de biomarcadores metastásicos.

7. DISEÑO EXPERIMENTAL Y POBLACIÓN DE ESTUDIO

Estudio de tipo experimental, analítico, longitudinal y prospectivo.

7.1 Criterios de inclusión, exclusión y eliminación

Inclusión

- Pacientes del Hospital General de México diagnosticados con Linfoma Difuso de Células B Grandes
- Tratados con el esquema R-CHOP
- Que cuenten con Tomografía por Emisión de Positrones (PET) para el seguimiento del padecimiento
- Mayores de 18 años
- Carta de consentimiento informado firmada.

Exclusión

- Pacientes con muestra biológica (celular o de material genético) insuficiente para el estudio de biología molecular.
- Comorbilidad con algún otro tipo de neoplasia maligna.

Eliminación

- Pacientes que abandonen el tratamiento y/o seguimiento
- Pacientes sin historial clínico completo

7.2 Variables de estudio

Independientes

Niveles de expresión de los biomarcadores *Ki67*, *BCL6*, *BCL10*, *CK19*, *VEGFR1*, *TWIST1*, *hTERT* y *MAGE-A3*

Dependientes

Comportamiento clínico reflejado en sobrevida global y libre de eventos de los pacientes

Tabla 5. Variables de estudio

Variable	Definición operacional	Tipo de variable	Escala de medición	Valores
Niveles de expresión de biomarcadores moleculares	Cuantificación relativa de niveles de expresión por RT-qPCR	Cualitativa	Nominal dicotómica	Normal/Elevado* Presencia/Ausencia
Edad	Edad del paciente al diagnóstico	Cualitativa	Nominal dicotómica	≤ 60 años > 60 años
Estadio Clínico	Determinación de sitios infiltrados por tumor	Cualitativa	Nominal	I II III IV
IPI (Índice Pronóstico Internacional)	Determinación de factores de riesgo	Cualitativa	Nominal	Bajo Intermedio-Bajo Intermedio-Alto Alto
R-IPI (Índice Pronóstico Internacional-Revisado)	Determinación de factores de riesgo	Cualitativa	Nominal	Muy bajo Bajo Alto
ECOG	Determinación del estado funcional del paciente	Cualitativa	Nominal	0 - 5
Género	Determinación de género	Cualitativa	Nominal dicotómica	Hombre Mujer
LDH	Cuantificación de la proteína sérica DHL	Cualitativa	Nominal dicotómica	Normal Elevada
Leucocitos	Cuantificación de leucocitos totales al diagnóstico	Cualitativa	Nominal	Bajo Normal Elevado
PET Intervalo	Reducción de la masa tumoral con respecto a la inicial	Cualitativa	Nominal dicotómica	Si No
PET final	Ausencia de actividad tumoral	Cualitativa	Nominal dicotómica	Si No
Recaída	Actividad tumoral en cualquier momento posterior a haber integrado remisión	Cualitativa	Nominal dicotómica	Si No
Muerte	Ausencia de signos vitales	Cualitativa	Nominal dicotómica	Vivo Muerto

*Niveles elevados/sobre expresión = Niveles de expresión en relación a los encontrados en individuos sanos

ECOG: Estado funcional (Eastern Cooperative Oncology Group), LDH: Lactato deshidrogenasa, PET: Tomografía por Emisión de Positrones

7.3 Tamaño de la muestra

El tamaño de la muestra se estableció con base en el número de casos de LDCBG que ingresan por año al Hospital General de México, utilizando el programa G*Power 3.1.9.2 (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf), con un nivel de confianza de 95% y con poder estadístico de 0.05. Tomando en cuenta que las pruebas estadísticas realizadas fueron para evaluar diferencia de medias y análisis de correlación, el tamaño de la muestra resultó de 60 pacientes con LDCBG y 60 individuos sanos.

8. METODOLOGÍA

8.1 Muestras biológicas

Líneas celulares

Se cultivaron las líneas celulares *K562* (eritroleucemia), *Reh*, *Jurkat* (Leucemia aguda linfoblástica), *U937* (linfoma histiocítico), *Ramos* y *2F7* (linfoma de Burkitt) en medio RPMI 1640 suplementado con Suero Fetal Bovino (SFB) al 10% en una atmósfera de CO₂ de 5% a 37°C. Dichas líneas celulares se utilizaron como control positivo de la expresión del panel de biomarcadores metastásicos.

SP de individuos sanos

Se recolectaron 60 muestras de SP de individuos clínicamente sanos del banco de sangre del Hospital General de México, para la obtención de células mononucleares, utilizados como controles de expresión normal y controles negativos de genes específicos de tumor.

SP de pacientes con LDCBG

Se obtuvieron muestras de SP de 60 pacientes con LDCBG al diagnóstico (T0= al diagnóstico), de los cuales, se realizó el seguimiento de 30 en dos tiempos durante la administración del esquema de tratamiento R-CHOP (T1= a la mitad del tratamiento y T2=al finalizar el tratamiento), para la obtención de células mononucleares.

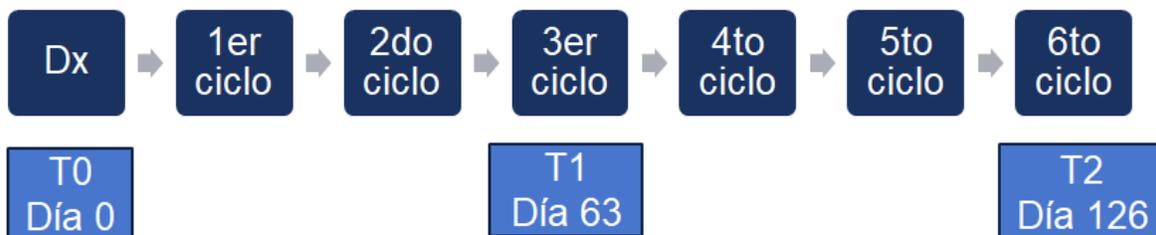


Figura 20. Ciclos de tratamiento de pacientes con LDCBG y momentos de la toma de muestra.

8.2 Enriquecimiento de CTCs

En la fase de enriquecimiento, las muestras de SP se mezclaron en proporción 1:1 con PBS 1X y se integraron con Ficoll-Hypaque en proporción 1:3 (Ficoll:Sangre). Las muestras se centrifugaron a 1500 rpm/20', se separó la interfase correspondiente a las células mononucleares y CTCs, se lavaron con PBS 1X y se homogenizaron con TRIzol. Posteriormente, fueron almacenadas a -80°C hasta ser utilizadas.

8.3 Extracción de RNA de células de individuos sanos, pacientes y líneas celulares

El RNA de las células de los individuos sanos, pacientes y líneas celulares, fue obtenido mediante TRIzol (Invitrogen, Life Technologies Carlsbad, CA) de acuerdo a las recomendaciones del proveedor. A las muestras celulares lisadas con TRIzol, se les adicionó cloroformo y se homogenizó. Posteriormente, se centrifugó a 12,000 rpm/15' a 4°C, se separó la fase acuosa y se precipitó el RNA con etanol al 100%, se lavó con etanol al 75%, y se resuspendió en agua libre de nucleasas. Para eliminar estructuras secundarias del RNA se incubó a 70°C/10'. Se determinó la concentración y pureza del RNA en espectrofotómetro UV-Vis (Thermo Scientific, Genesys 10S UV-Vis).

8.4 Determinación de la integridad y cuantificación del RNA

Se determinó la concentración y pureza del RNA total mediante la determinación de la absorbancia de las muestras a 260 y 280 nm de longitud de onda en espectrofotómetro UV-Vis (Thermo Scientific, Genesys 10S UV-Vis). La integridad del material genético se corroboró mediante una corrida electroforética en gel de agarosa al 1%, durante 40' a 70 volts. El gel evidenció las bandas 18S y 28S del RNA ribosomal (rRNA) que confirma la integridad. Este se almacenó a -80°C hasta ser requerido.

8.5 Síntesis de DNA complementario (cDNA)

La síntesis de DNA complementario (cDNA) se realizó a partir de 2500 ng de RNA de las líneas celulares, individuos sanos y pacientes, empleando Oligo dT y la enzima transcriptasa reversa

MML-V, de acuerdo a las indicaciones del proveedor (PROMEGA, Madison WI, USA). El cDNA se almacenó a -80°C hasta ser utilizado.

8.6 Diseño de primers

Se diseñaron 10 pares de oligonucleótidos específicos para los transcritos de los genes *GAPDH*, *β2-microglobulina*, *Ki67*, *BCL6*, *BCL10*, *CK19*, *VEGFR1*, *TWIST1*, *hTERT*, y *MAGE-A3*, utilizando las herramientas bioinformáticas de “National Center for Biotechnology Information (NCBI)”, GenBank y Primer Blast.

Tabla 6. Primers para la amplificación de biomarcadores

Gen	Oligo Fw	Oligo Rw	Amplición (pb)
<i>Ki67</i>	AAATTTGCTTCTGGCCTTCCC	AGTCATCTGCGGTACTGTCT	588
<i>BCL6</i>	GACATCATGGCCTATCGGGG	CGTGCCTCTTCTGGGATTGT	353
<i>BCL10</i>	CTGAAGTGAAGAAGGACGCC	TCTGGAAAAGGTTCACTACTGC	340
<i>CK19</i>	TCGCCATGACTTCCTACAGC	TGGTTAGCTTCTCGTTGCC	255
<i>VEGFR1</i>	CTAACATGCACCTGTGTGGC	AGAGCTTTGTACTCGCTGGC	341
<i>TWIST1</i>	CTACGCCTTCTCGGTCTGGA	CGCCCTGTTTCTTTGAATTTGG	234
<i>hTERT</i>	CTGTGCGAAGCAGAGGTCAG	CCGTCACATCCACCTTGACA	343
<i>MAGE-A3</i>	TGGAGGACCAGAGGCCCCC	GGACGATTATCAGGAGGCCTGC	725

8.7 Determinación de los niveles de expresión de biomarcadores en individuos sanos y pacientes con LDCBG por RT-qPCR

La eficiencia de la síntesis de cDNA se corroboró mediante la amplificación de los genes de referencia *β2-microglobulina* (*B2-M*) y *GAPDH* (394 pb y 221 pb respectivamente), para demostrar la integridad del material genético. Los productos de reacción se observaron en una corrida electroforética en gel de agarosa al 2% en transluminador UV.

La cuantificación relativa de los biomarcadores en los individuos sanos y pacientes, se realizó a partir de 250 ng de cDNA, con SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Life Technologies), oligo Fw y Rw en concentración 0.2 μM, en volumen final de 20 μL. Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización 15"/95°C, hibridación y elongación 1"/60°C (40 ciclos). Las reacciones se realizaron por triplicado en el equipo Step One™ Applied Biosystems; se utilizó como gen de referencia *β2-microglobulina* y como muestras de referencia las líneas celulares onco-hematológicas. Los niveles de expresión se obtuvieron con el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

8.8 Secuenciación de los productos de RT-PCR

Los productos de RT-PCR punto final fueron purificados mediante el Kit GeneAll® SV Column type D de acuerdo a las condiciones del proveedor (GeneAll Biotechnology). Posteriormente se realizó la reacción de secuenciación de una sola cadena con el Kit BidDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems) utilizando el secuenciador ABI-3730 XL DNA Analyser (Applied Biosystems). Las secuencias obtenidas se alinearon en la herramienta bioinformática BLAST (NCBI), para validar que los amplicones obtenidos eran los esperados.

9. RESULTADOS

Se analizaron mediante RT-qPCR un total de 60 donadores sanos y 60 pacientes del servicio de Hematología del Hospital General de México con diagnóstico clínico-patológico de LDCBG. Se realizó el seguimiento de 30 pacientes a dos tiempos adicionales (T0=al diagnóstico, T1= a la mitad del tratamiento y T2=al finalizar el tratamiento).

9.1 Caracterización clínico-patológica de pacientes con LDCBG

La población de pacientes con LDCGB estuvo conformada por 26 mujeres (43%) y 34 hombres (57%), con media de edad de 59 años (22–87 años). De acuerdo a los resultados emitidos por el Servicio de Patología, 36 de los casos corresponden al subtipo de LDCBG originado del CG (60%) y 24 (40%) al de CBA, determinado mediante el análisis de biopsia de tejido neoplásico siguiendo el algoritmo de Hans (CD10, BCL6, MUM-1).

En la biometría hemática se encontraron cuentas leucocitarias con un valor medio de 8.9×10^3 leucocitos/ μL ($1.7\text{--}61.3 \times 10^3$ leucocitos/ μL). Las plaquetas tuvieron un valor medio de $262.7 \times 10^3/\mu\text{L}$ (79 - $491 \times 10^3/\mu\text{L}$), de los cuales el 10% (6/60) presentaban cuenta elevada de plaquetas.

En cuanto a los parámetros utilizados para la determinación de IPI y R-IPI (edad, estado funcional ECOG, niveles de LDH, sitios extranodales y estadio clínico), se encontró que el 55% (33/60) de los pacientes eran menores de 60 años y el 45% (27/60) mayores de dicha edad. En cuanto al estado funcional ECOG, predominó el "0" en 68% (41/60) de los pacientes, en otras palabras, su estado funcional era "totalmente activo". Los valores de LDH tuvieron una media de 271.2 U/L (105-881 U/L), observando que 53% (32/60) de los pacientes presentaron concentraciones mayores a las del rango normal. El 48% (29/60) de los pacientes contaban con la presencia de sitios extranodales infiltrados por células tumorales. Por su parte, 52% (31/60) de los pacientes presentaron afectaciones únicamente ganglionares. El estadio clínico que prevaleció fue el IV con 43% (26/60), seguido del II con 25% (15/60). En la Tabla 7 se resumen los parámetros clínico-patológicos de los pacientes analizados.

Tabla 7. Características clínico-patológicas de pacientes con LDCBG en seguimiento al diagnóstico (T0).

Parámetro		N (%)	Media (rango)
Edad (años)			59 (22-87)
Género	Masculino	34 (57)	
	Femenino	26 (43)	
Estadio clínico	I	6 (10)	
	II	15 (25)	
	III	13 (22)	
	IV	26 (43)	
Sitios extranodales	Si	29 (48)	
	No	31 (52)	
ECOG	0	41 (68)	
	1	7 (11)	
	2	2 (3)	
	3	5 (8)	
	4	5 (8)	
DHL (U/L)	Normal	28 (47)	271.2 (105 – 881)
	Elevada	32 (53)	
IPI	Bajo	19	
	Intermedio bajo	12	
	Intermedio alto	19	
	Alto	10	
R-IPI	Muy bueno	6	
	Bueno	25	
	Malo	29	
Leucocitos (x 10 ³ /μL)	Bajos	4 (7)	8.9 (1.7 – 61.3)
	Normal	45 (75)	
	Elevados	11 (18)	
Célula de origen	Centro Germinal	36 (40)	
	Linfocito B Activado	24 (60)	
PET Intervalo	Buena respuesta	45 (75)	
	Actividad tumoral	15 (25)	
PET Final	Respuesta completa	46 (77)	
	Progresión de la enfermedad	14 (23)	
Recaída	Si	11 (18)	
	No	49 (82)	
Comportamiento clínico	Vivo	53 (89)	
	Muerto	8 (11)	

9.2 Análisis de la integridad del material genético

Se aisló RNA de la totalidad de las muestras, observando las bandas características 18S y 28S del RNA ribosomal (Figura 21). La eficiencia de la síntesis de cDNA se corroboró amplificando los genes de referencia *β2-microglobulina (B2-M)* y *GAPDH* (394 pb y 221 pb respectivamente) (Figura 22). Ambas se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% en transluminador UV.

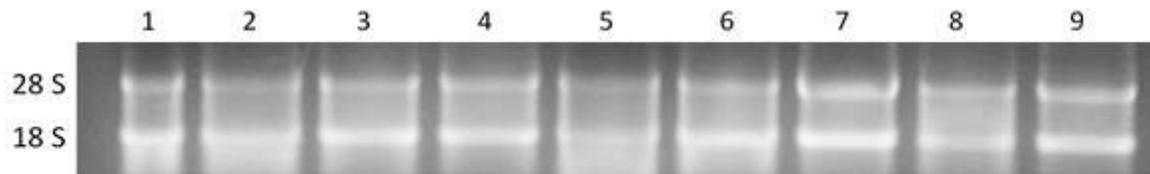
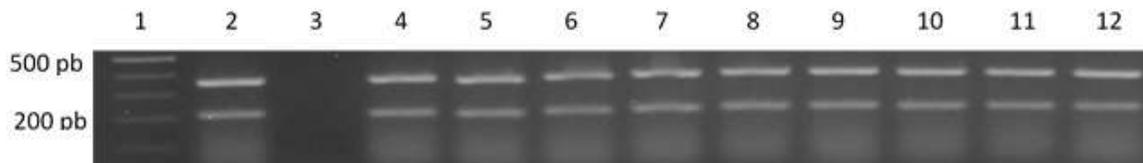


Figura 21. Determinación de la integridad de RNA de muestras biológicas.

RNA de líneas celulares (carriles 1–2), individuos sanos (carriles 3–6), pacientes con



LDCBG (carriles 7-9).

Figura 22. PCR multiplex de los genes constitutivos $\beta 2$ -microglobulina y GAPDH.

Carril 1: Marcador de peso molecular; carril 2: Control positivo (Ramos); carril 3: Control de reacción (H_2O); carril 4 – 12 pacientes con LDCBG.

9.3 Estandarización de la amplificación de biomarcadores metastásicos

Se establecieron mediante PCR en punto final las condiciones de amplificación para cada gen del panel de biomarcadores utilizando como controles positivos líneas celulares de origen onco-hematológico (Figura 23).

Posteriormente, usando la misma metodología, se determinó el perfil de expresión de los biomarcadores en 6 líneas celulares hematológicas (K562, Jurkat, Reh, U937, 2F7 y Ramos) (Tabla 8).

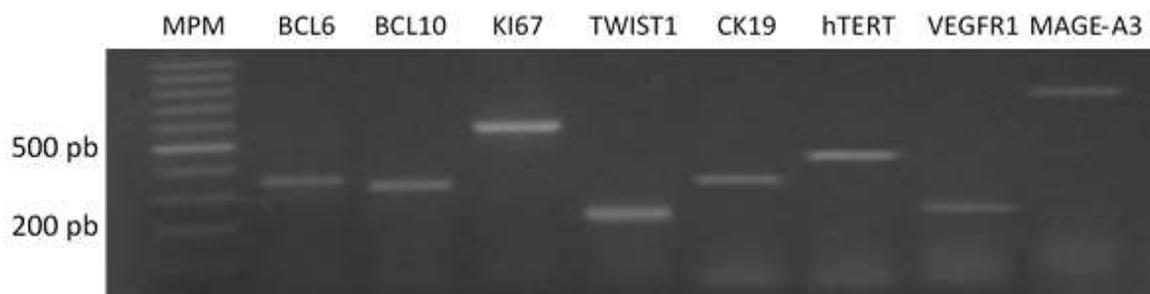


Figura 23. Biomarcadores obtenidos a partir de líneas celulares onco-hematológicas.

Carril 1: Marcador de peso molecular; carril 2: *BCL6* (353 pb), carril 3: *BCL10* (340 pb); carril 4 *Ki67* (588 pb); carril 5: *TWIST1* (234 pb); carril 6: *CK19* (255 pb); carril 7: *hTERT* (343 pb); carril 8 *VEGFR1* (341 pb); carril 9: *VEGFR-2* (396 pb); carril 10: *MAGE-A3* (725 pb). Amplicones de *BCL6*, *BCL10*, *Ki67*, *TWIST1*, *CK19*, *VEGFR1* y *MAGE-A3* obtenidos a partir de *K562* y *hTERT* obtenido de *Jurkat*.

Tabla 8. Determinación de biomarcadores moleculares en líneas celulares hematológicas por PCR en punto final.

Línea celular/Biomarcador	<i>BCL-6</i>	<i>BCL-10</i>	<i>Ki-67</i>	<i>TWIST1</i>	<i>hTERT</i>	<i>CK19</i>	<i>VEGFR-1</i>	<i>MAGE-A3</i>
K-562	+	+	+	+	-	+	+	+
Reh	+	+	+	+	-	+	+	+
U937	+	+	+	+	+	-	+	-
Jurkat	+	+	+	-	+	+	+	-
2F7	+	+	-	-	-	-	-	+
Ramos	+	+	+	-	-	.	-	+

Se encontró que las células K562 y Reh fueron las líneas onco-hematológicas con un mayor número de biomarcadores metastásicos expresados (7/8); seguidas de U937 y Jurkat (6/8); Ramos (4/8) y por último 2F7 (3/7).

A su vez, se establecieron los niveles de expresión de la totalidad de los biomarcadores mediante RT-qPCR, en los que se encontró que la línea celular Ramos fue la que presentó el mayor nivel de expresión de los genes *Ki67* y *BCL6*. Asimismo, K562 resultó con el nivel de expresión más elevado de *BCL10*, *TWIST1* y *MAGE-A3*, mientras que Jurkat tuvo los niveles más altos de expresión de *CK19* y *hTERT*. La línea celular REH tuvo el nivel más alto de *VEGFR1* (Figura 26).

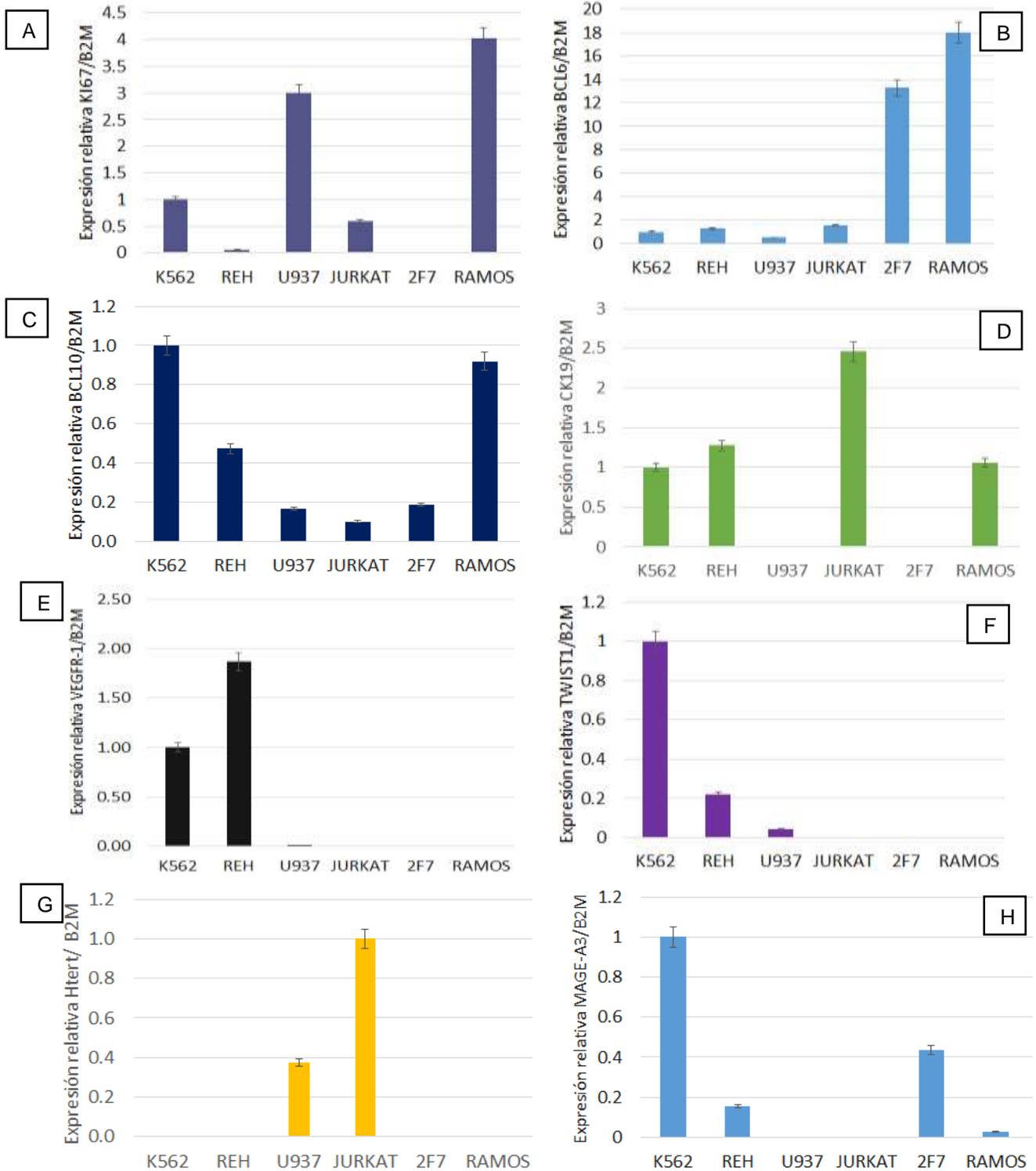


Figura 24. Niveles de expresión de biomarcadores (A) *KI67*, (B) *BCL6*, (C) *BCL10*, (D) *CK19*, (E) *VEGFR1*, (F) *TWIST1*, (G) *hTERT* y (H) *MAGE-A3* en líneas celulares.

9.4 Secuenciación de productos de RT-PCR

Por otra parte, se realizó la secuenciación de la totalidad de los amplicones obtenidos por PCR punto final y se alinearon en la herramienta bioinformática BLAST (NCBI), comprobando que los productos de reacción obtenidos corresponden a los esperados. En la Figura 25 se muestra el ejemplo de la secuenciación del transcrito de *Ki67* obtenido a partir de la línea celular Ramos.

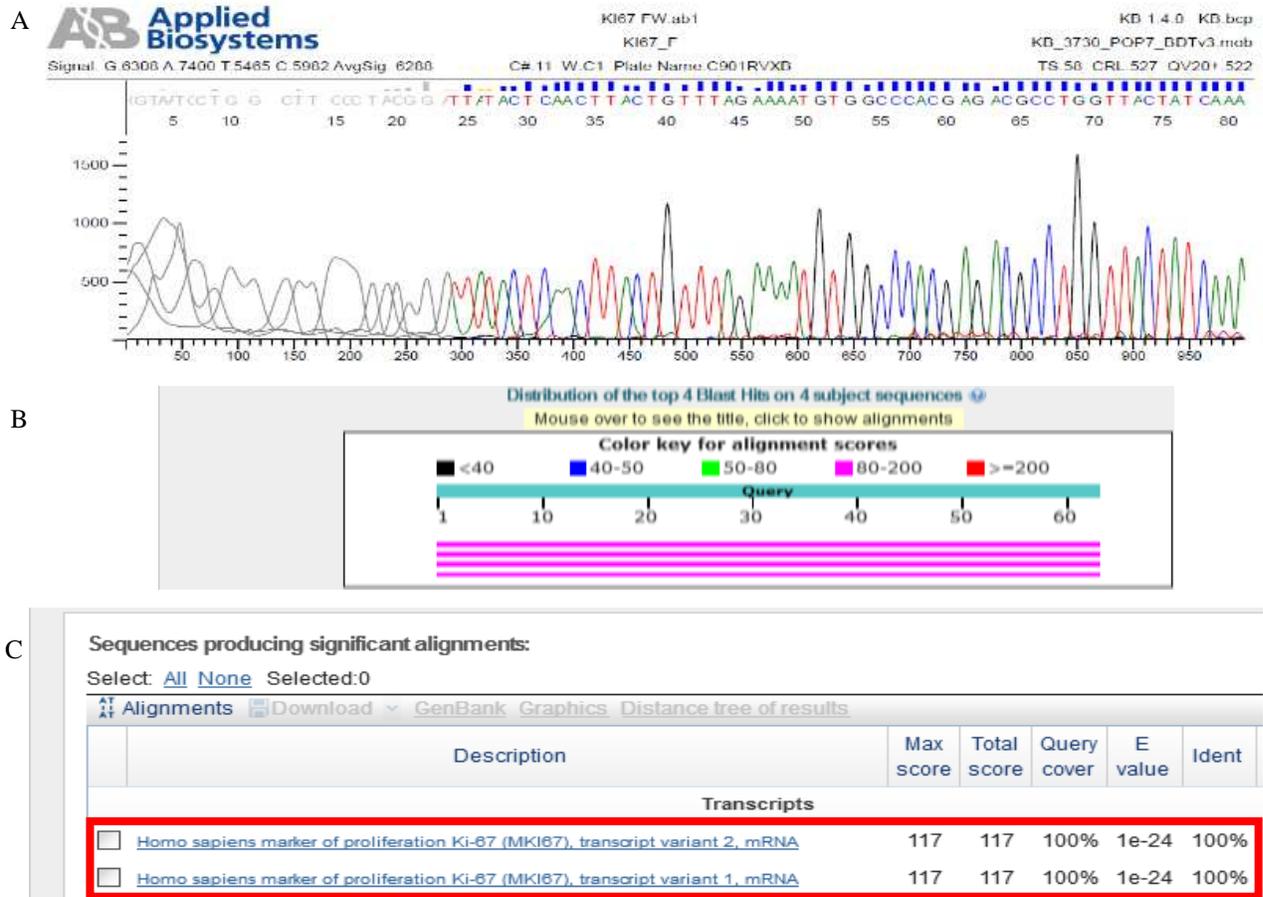


Figura 25. Alineación en BLAST (NCBI) de la secuencia del biomarcador *Ki67*.

A) Electroferograma obtenido de la secuenciación del amplicón de *Ki67*, B) Alineación en BLAST de 80 nucleótidos de la secuencia obtenida, C) 100% de concordancia entre la secuencia obtenida y la esperada

9.5 Expresión de biomarcadores en sangre periférica de individuos sanos

Se estableció que no existe expresión de los genes *TWIST1*, *hTERT* y *MAGE-A3* en células mononucleares de individuos sanos. Esto se determinó al analizar la expresión del panel de biomarcadores en 60 muestras, comprobando su especificidad en células tumorales (genes específicos de tumor).

Para el caso de los transcritos de los genes *KI67*, *BCL6*, *BCL10*, *CK19* y *VEGFR1* se definió, mediante RT-qPCR el rango de expresión basal para dichos genes en los mismos 60 individuos sanos (Figura 26).

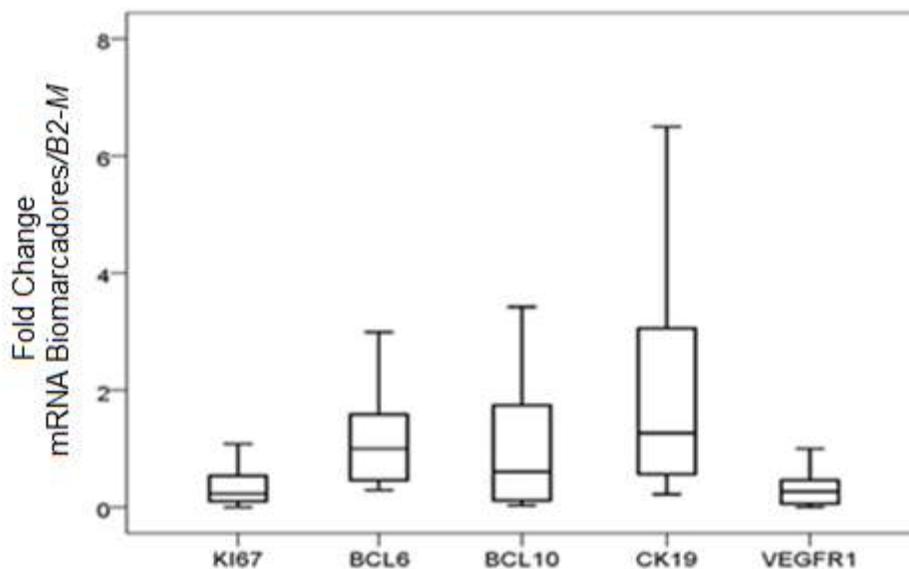
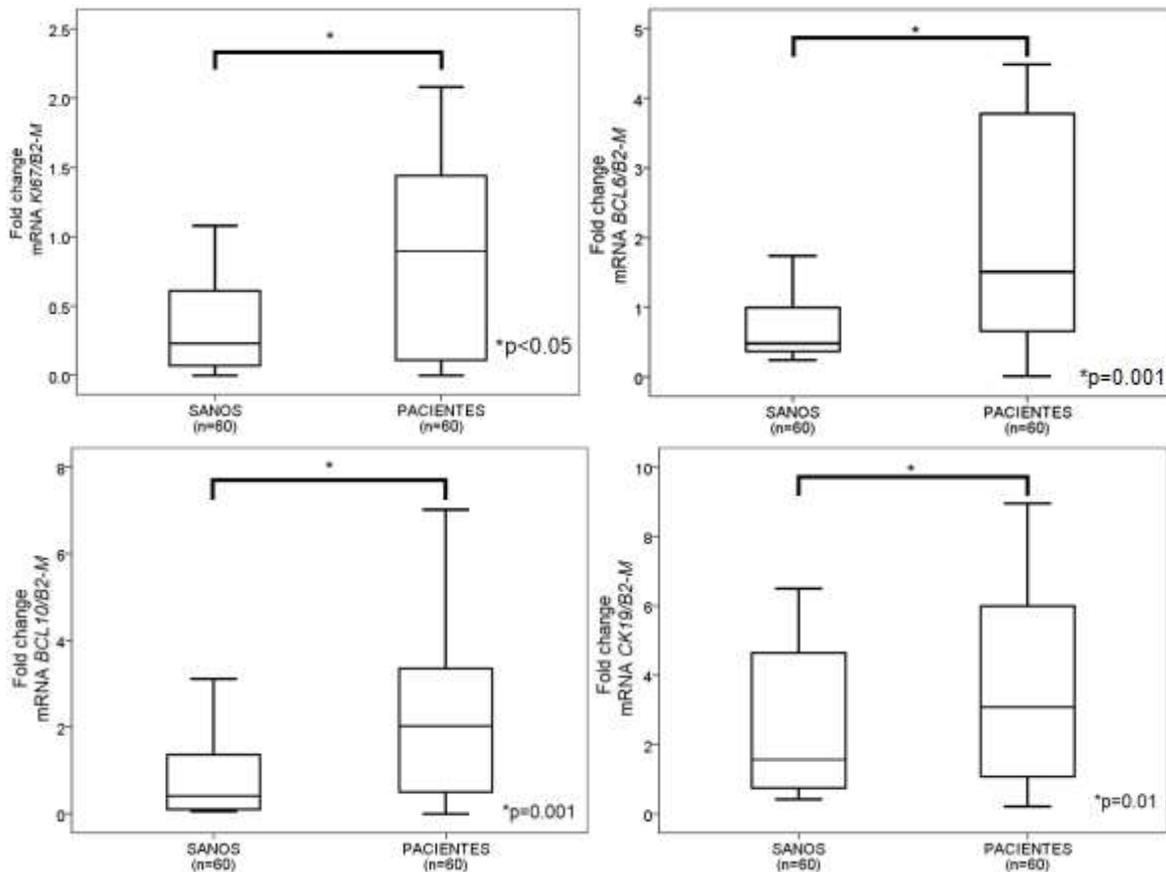


Figura 26. Determinación de los niveles de expresión de los genes *KI67*, *BCL6*, *BCL10*, *CK19* y *VEGFR1* en individuos sanos.

9.6 Niveles de expresión de biomarcadores metastásicos en pacientes con LDCBG al diagnóstico.

Con base en los niveles de expresión de los genes *Ki67*, *BCL6*, *BCL10*, *CK19* y *VEGFR1* que se encontraron en los individuos sanos, se estableció el nivel de expresión normal de estos y fueron tomados como referencia para estratificar a los pacientes en 1) pacientes con expresión normal o 2) pacientes con niveles de sobre expresión / niveles de expresión elevada, de acuerdo a sus respectivos niveles. En la Figura 27 se observan los niveles de expresión de los pacientes con LDCBG en comparación con los individuos sanos



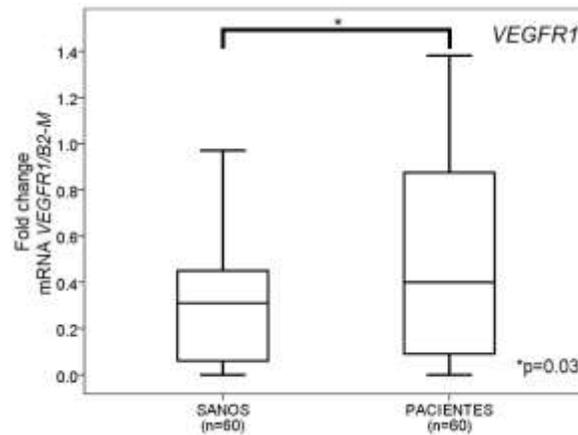


Figura 27. Determinación de los niveles de expresión de los biomarcadores A) *KI67*, (B) *BCL6*, (C) *BCL10*, (D) *CK19*, (E) *VEGFR1* en individuos sanos y pacientes con LDCBG *de novo*.

Se realizó la prueba de “t” de student para evaluar diferencias significativas entre las medias de expresión de los biomarcadores de los individuos sanos y los 60 pacientes con LDCBG al diagnóstico (T0), resultando estadísticamente mayores las de los pacientes que las de los individuos sanos para *KI67*, *BCL6*, *BCL10*, *CK19* y *VEGFR1* ($p < 0.05$) (Figura 27).

Las frecuencias de sobre expresión de *KI67*, *BCL6*, *BCL10*, *CK19* y *VEGFR1* y la expresión de los genes específicos de tumor (*TWIST1*, *hTERT* y *MAGE-A3*) se describen en la Tabla 9.

Tabla 9. Frecuencia de expresión de biomarcadores en pacientes con LDCBG al diagnóstico (T0)

Biomarcador	Pacientes (n)	Frecuencia (Sobre expresión /Presencia)* (%)
<i>KI67</i>	29	48
<i>BCL6</i>	17	28
<i>BCL10</i>	17	28
<i>CK19</i>	11	20
<i>VEGFR1</i>	15	25
<i>TWIST1</i>	17	28
<i>hTERT</i>	2	3
<i>MAGE-A3</i>	2	3

*Sobre expresión para el caso de *KI67*, *BCL6*, *BCL10*, *CK19* y *VEGFR1*;
Presencia para el caso de *TWIST1*, *hTERT* y *MAGE-A3*

El gen con mayor frecuencia de sobre expresión fue el marcador de proliferación *Ki67* con 48% (29/60), seguido de *BCL6*, *BCL10* y *TWIST1* con 28% (17/60), luego el marcador de angiogénesis *VEGFR1* con 25% (15/60), el marcador epitelial *CK19* con 18% (11/60), y por último, los genes específicos de tumor *hTERT* y *MAGE-A3* con 3% (2/60).

9.7 Co-expresión de biomarcadores en pacientes con LDCBG al diagnóstico.

Al analizar la co-expresión de biomarcadores en los pacientes con LDCBG, el 80% (48/60) de la población de estudio tuvo niveles de expresión elevada de al menos un biomarcador. La co-expresión de 2 biomarcadores fue el rubro de mayor frecuencia con 33% (20/60). El número máximo de biomarcadores co-expresados fue de 5 (*KI67*, *BCL6*, *CK19*, *VEGFR1* y *hTERT*), en 1 paciente. Las combinaciones de sobre expresión y presencia de los biomarcadores se describe en la Tabla 10.

Tabla 10. Frecuencia de expresión y co-expresión de biomarcadores

Biomarcadores sobre expresados	Pacientes (n)	Frecuencia (%)
0	12	20
1	11	18
2	20	33
3	11	18
4	5	9
5	1	2

Se encontraron pacientes que co-expresan los mismos biomarcadores. En la co-expresión de 2 biomarcadores se encontró que la combinación más frecuente fue *KI67-VEGFR1* en 4 pacientes (7%), seguida de *KI67-BCL6*, *KI67-BCL10*, *KI67-CK19*, *KI67-TWIST1*, *BCL6-CK19* y *BCL10-VEGFR1* en dos pacientes (3%), respectivamente. La combinación de genes *KI67-BCL6-CK19* y *KI67-BCL10-TWIST1* se encontró en dos pacientes (3%), respectivamente. Es de resaltar el hecho de que *KI67* se encontró en 70% (26/37) de la totalidad de las combinaciones de co-expresión de biomarcadores (Tabla 11).

Tabla 11. Descripción de los biomarcadores co-expresados al diagnóstico

No. De genes co-expresados	Biomarcadores co-expresados
2	<i>KI67, BCL6 (2)</i>
	<i>KI67, BCL10 (2)</i>
	<i>KI67, CK19 (2)</i>
	<i>KI67, VEGFR1 (4)</i>
	<i>KI67, TWIST1 (2)</i>
	<i>BCL6, CK19 (2)</i>
	<i>BCL6, VEGFR1</i>
	<i>BCL6, TWIST1</i>
	<i>BCL10, VEGFR1 (2)</i>
	<i>BCL10, TWIST1</i>
3	<i>VEGFR1, TWIST1</i>
	<i>KI67, BCL6, CK19 (2)</i>
	<i>KI67, BCL6, TWIST1</i>
	<i>KI67, BCL10, TWIST1 (2)</i>
	<i>KI67, BCL10, VEGFR1</i>
	<i>KI67, BCL10, MAGE-A3</i>
	<i>KI67, CK19, TWIST1</i>
	<i>KI67, VEGFR1, TWIST1</i>
<i>BCL6, BCL10, MAGE-A3</i>	
<i>BCL10, VEGFR1, TWIST1</i>	
4	<i>KI67, BCL6, BCL10, TWIST1</i>
	<i>KI67, BCL6, TWIST1, hTERT</i>
	<i>KI67, BCL10, CK19, VEGFR1</i>
	<i>KI67, BCL10, CK19, TWIST1</i>
	<i>BCL6, BCL10, VEGFR1, TWIST1</i>
5	<i>KI67, BCL6, CK19, VEGFR1, hTERT</i>

9.8 Correlación de biomarcadores y parámetros clínicos de pacientes con LDCBG al diagnóstico.

Los parámetros clínico-patológicos que se evaluaron para el análisis de asociación fueron: género, edad, fenotipo, leucocitos, LDH, sitios extranodales, IPI, R-IPI, PET de intervalo, PET de final de tratamiento, recaída y desenlace clínico. Para el análisis estadístico se usó la prueba de Chi cuadrada de Pearson con un nivel de confianza de 0.05.

Se encontró asociación entre los niveles elevados del marcador de proliferación *KI67* con la presencia de infiltración de sitios extranodales por células cancerosas ($p=0.01$), así como con la aparición de un PET de final de tratamiento con actividad tumoral ($p=0.048$); es decir, con refractariedad al tratamiento.

Con lo que respecta al marcador de resistencia a la apoptosis *BCL6*, se encontró relación entre los niveles normales de *BCL6* y un comportamiento clínico favorable, evidenciado en la sobrevida de los pacientes. Por otra parte, se observó que la expresión normal de *BCL10* está relacionada con una buena respuesta al tratamiento R-CHOP, pues los pacientes con niveles normales de éste presentaron disminución de más del 50% de la masa tumoral en el PET de intervalo.

No se encontró relación entre los parámetros clínicos y la sobre expresión de los genes *CK19* y *VEGFR1*. Sin embargo, es de resaltar el hecho de que 55% de los pacientes con sobre expresión de *CK19* presentaron el estadio más avanzado de la enfermedad. Por otra parte, llama la atención que *VEGFR1* se encontró sobre expresado en 31% de los pacientes que presentaron infiltración tumoral en sitios extranodales al diagnóstico, lo cual corresponde al 60% de los pacientes con sobre expresión de dicho receptor.

En cuanto a la expresión de los genes específicos de tumor, se encontró relación entre la presencia de *hTERT* y un comportamiento clínico desfavorable del paciente. Si bien solo 2/60 pacientes lo expresaron, resultaron ser los sujetos con la menor sobrevida de la totalidad de la población analizada (5.4 y 5.8 meses).

Para los dos genes específicos de tumor restantes (*TWIST1* y *MAGE-A3*), no se encontraron asociaciones estadísticamente significativas. Sin embargo, se determinó expresión de *TWIST1* en 28% de los pacientes con estadios avanzados (III y IV) de la enfermedad y en más de la tercera parte (35%) de la población que resultó refractaria al tratamiento. Por su parte, *MAGE-*

A3 se encontró expresado en casos de pacientes masculinos mayores de 60 años de edad; uno de ellos presentó recaída temprana posterior a la remisión del padecimiento.

Por último, se observó que el paciente con mayor número de biomarcadores co-expresados (5), tuvo el ECOG más alto (4=incapaz de realizar actividades por sí mismo, postrado en cama).

En la Tabla 12 se presenta el análisis de correlación de los biomarcadores *KI67*, *BCL6*, *BCL10*, *CK19* y *VEGFR1* y los parámetros clínicos de los pacientes como ejemplo del análisis de Chi cuadrada de Pearson realizado.

Tabla 12. Correlación de la expresión de biomarcadores y parámetros clínicos de los pacientes con LDCBG al diagnóstico T0.

Biomarcadores	Ki67		BCL6		BCL10		CK19		VEGFR1		
	Normal	Elevado									
	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	
Parámetros clínicos											
Género	14	12	21	5	19	7	21	5	19	7	
Masculino	17	17	22	12	25	9	28	6	26	8	
Leucocitos	26	23	35	14	37	12	41	8	35	14	
Normal	5	6	8	3	7	4	8	3	10	1	
Elevados	16	20	27	9	27	9	31	5	29	7	
Origen histológico	15	9	16	8	17	7	18	6	16	8	
Célula B Activa	16	17	25	8	27	6	28	5	25	8	
<60 años	15	12	18	9	17	10	21	6	20	7	
>60 años	12	16	21	7	17	11	23	5	16	12	
LDH	19	13	22	10	27	5	26	6	29	3	
Normal	21	10	20	11	26	5	27	4	25	6	
Elevada	10	19*	23	6	18	11	22	7	20	9	
Sitios Extranodales	2	4	6	0	4	2	4	2	5	1	
I	10	5	10	5	13	2	13	2	12	3	
II	9	4	6	7	10	3	12	1	10	3	
III	10	16	21	5	17	9	20	6	18	8	
IV	11	8	15	4	15	4	15	4	14	5	
Bajo	7	5	7	5	10	2	12	0	10	2	
Int Bajo	9	10	14	5	12	7	16	3	14	5	
Int Alto	4	6	7	3	7	3	6	4	7	3	
Alto	4	2	5	1	5	1	5	1	4	2	
Muy bueno	14	11	17	8	20	5	22	3	20	5	
Bueno	13	16	21	8	19	10	22	7	21	8	
Malo	23	22	33	12	36*	9	36	9	34	11	
Buena Respuesta	8	7	10	5	8	7	13	2	11	4	
Actividad Tumoral	27	19	33	13	35	11	36	10	34	12	
Remisión	4	10*	10	4	9	5	13	1	11	3	
Actividad Tumoral	25	24	37	12	37	12	39	10	36	13	
No	6	5	6	5	7	4	10	1	9	2	
Si	28	26	41*	13	38	16	44	10	41	13	
Vivo	3	3	2	4	6	0	5	1	4	2	
Muerto											
Situación actual											

LDH= lactato deshidrogenasa; IPI= Índice Pronóstico Internacional; R-IPI= Índice Pronóstico Internacional-Revisado;

PET= Tomografía por Emisión de Positrones

*Prueba de Correlación p<0.05

9.9 Análisis de supervivencia global y supervivencia libre de eventos en pacientes con LDCBG al diagnóstico.

Para el análisis de SG (periodo que transcurre desde el diagnóstico hasta la última consulta realizada o el fallecimiento del paciente), y SLE (periodo posterior al tratamiento durante el que el paciente vive sin signos ni síntomas de la enfermedad), se consideraron las fechas de diagnóstico, y de recaída o muerte (en caso de existir). La fecha de inicio se determinó como la fecha en que se emitió el diagnóstico de LDCBG por parte de patología. El tiempo de seguimiento medio fue de 621 días (20.7 meses; rango de 5.4 – 29.5 meses). Para el análisis de supervivencia se utilizó el método de Kaplan Meier y la diferencia entre grupos se realizó mediante el test de log Rank. Se determinó que la población analizada tuvo una supervivencia global del 90% y supervivencia libre de eventos del 77%. Conjuntamente, se realizó el análisis de supervivencia global en relación a la expresión de los biomarcadores metastásicos, encontrando asociación estadísticamente significativa para *BCL6* y *hTERT*, tanto para la supervivencia global, como en la supervivencia libre de eventos. Para el resto de los biomarcadores no se encontraron datos estadísticamente significativos.

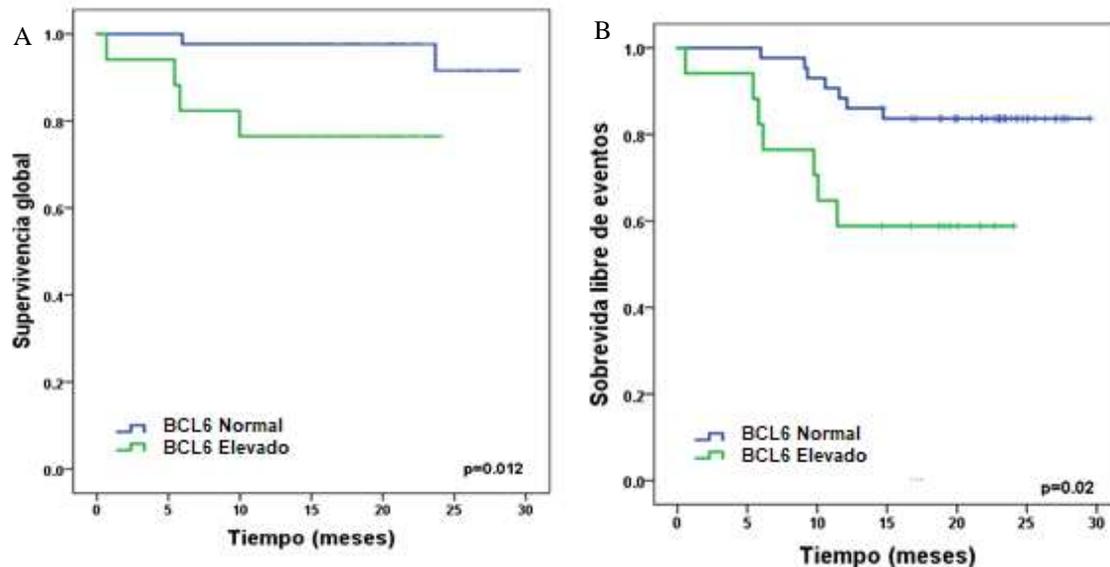


Figura 28. Análisis de A) supervivencia global y B) supervivencia libre de eventos de pacientes con LDCBG en relación a la expresión de *BCL6*.

Se observó una menor supervivencia global y supervivencia libre de eventos en aquellos pacientes que sobre expresaron el gen *BCL6*, en comparación con los que tuvieron valores de expresión normales del mismo. En el periodo de seguimiento se encontró que 23% (4/17) de los pacientes que sobre expresaron *BCL6* murieron, en comparación con el 4.6% (2/43) de pacientes que murieron y tenían niveles normales de dicho gen (p=0.012) (Figura 28 A). Además, los pacientes que tuvieron sobre expresión de *BCL6* registraron una mayor frecuencia de eventos adversos relacionados con su patología (recaída) en comparación con el grupo con expresión normal del mismo (41.2% vs 16,3%, p=0.02) (Figura 28 B).

Así mismo, se encontró relación entre la sobre expresión de *BCL6* y una sobrevida libre de eventos menor, tanto en los pacientes con subtipo del CG (89% vs 67%) como en los de CBA (75% vs 50%), resultando estadísticamente significativo ($p=0.039$). La sobre expresión de *BCL6* resultó desfavorable en pacientes con ambos subtipos de LDCBG (Figura 29).

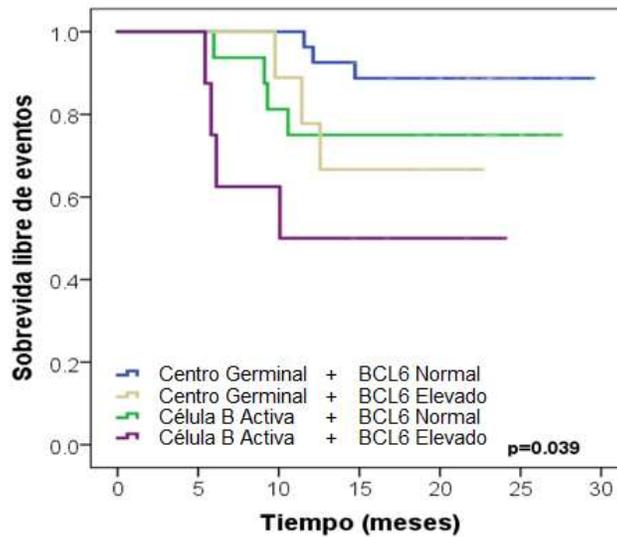


Figura 29. Análisis de sobrevida libre de eventos de pacientes con LDCBG en relación a Célula de Origen – *BCL6*.

De la misma manera, los pacientes que tuvieron expresión de *hTERT* tuvieron una SG menor (93.1% vs 0%, $p<0.05$), y menor SLE (79.3% vs 0%, $p<0.05$), en comparación con los que lo tuvieron ausente (Figura 30).

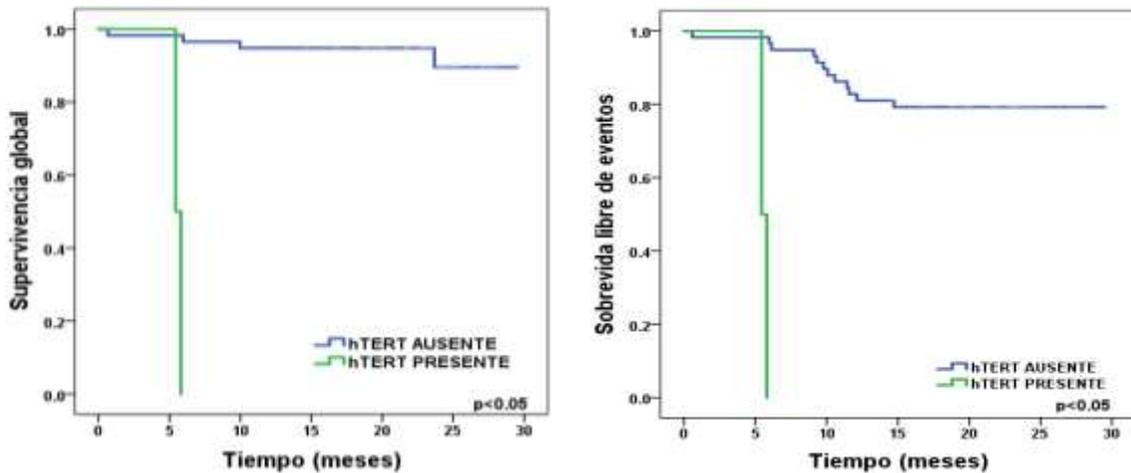


Figura 30. Análisis de supervivencia global y sobrevida libre de eventos de pacientes con LDCBG en relación a la expresión de *hTERT*.

De la misma manera, se observó que el número de genes específicos de tumor expresados tuvieron impacto en la SLE, pues pacientes que expresaron 1 y 2 genes específicos de tumor tuvieron SLE menor que los pacientes que no expresaron *TWIST1*, *hTERT* o *MAGE-A3*.

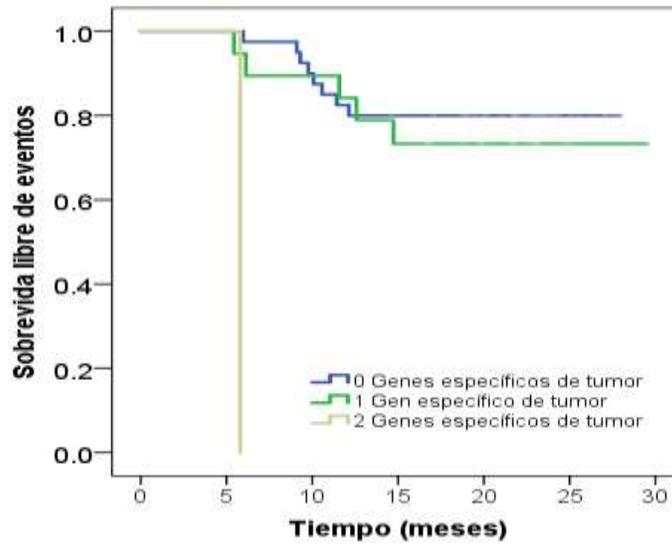


Figura 31. Análisis de supervivida libre de eventos de pacientes con LDCBG en relación al número de genes específicos de tumor expresados

9.10 Niveles de expresión de biomarcadores metastásicos en pacientes con LDCBG a la mitad (T1) y al final (T2) del tratamiento.

De los 60 pacientes analizados al diagnóstico, se realizó el seguimiento de 30 de ellos, tanto a la mitad (T1), como al final (T2), del esquema de tratamiento R-CHOP (6 ciclos).

En las muestras de los pacientes a la mitad del tratamiento (T1) se encontró una frecuencia de sobre expresión de *Ki67* del 23% (7/30), del 10% (3/30) para *BCL6*, de 13% (4/39) para *BCL10*, de 20% (6/20) para *CK19*, de 7% (2/30) para *VEGFR1* y *TWIST1* se encontró expresado en el 3% (1/30). No se encontró expresión de *hTERT* y *MAGE-A3*, incluso en los pacientes que los expresaron a T0.

Se compararon las frecuencias de sobre expresión o presencia de genes específicos de tumor entre los pacientes al diagnóstico (T0) y a la mitad (T1) del tratamiento (3 ciclos), observando que, salvo *CK19* que tiene la misma frecuencia de expresión elevada, el resto de los biomarcadores disminuyeron su frecuencia. Tanto el marcador de proliferación *Ki67* como el marcador epitelial *CK19* prevalecieron en mayor proporción con 23% y 20% respectivamente.

Posteriormente, se determinaron los niveles de expresión de biomarcadores en las muestras del final (T2) del esquema de tratamiento R-CHOP (6 ciclos). En éstas se encontró una frecuencia de sobre expresión de *Ki67* del 13% (4/30), *BCL10*, *CK19* y *VEGFR1* de 7% (2/30), respectivamente, *TWIST1*, *BCL6* y *MAGE-A3* en el 3% (1/30), y de *hTERT* no se encontró expresión.

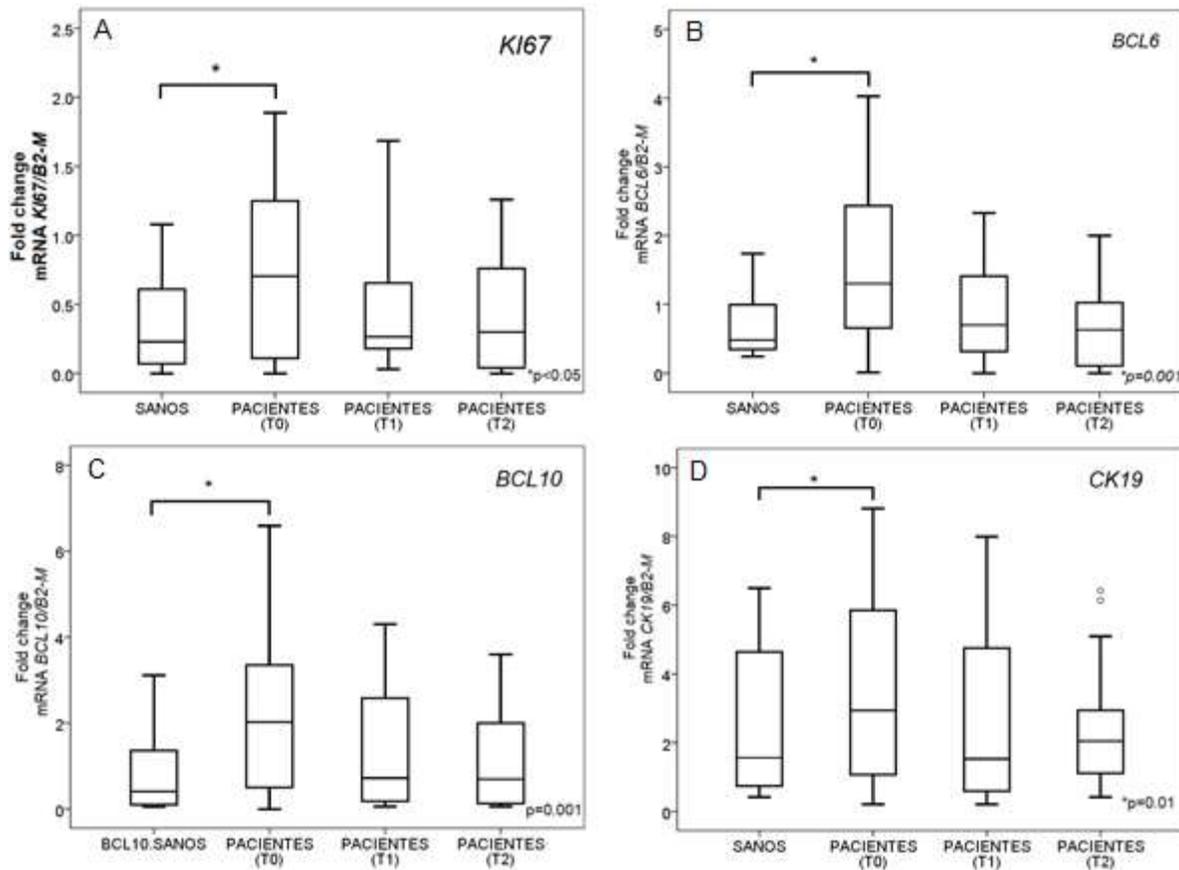
Se compararon las frecuencias de sobre expresión o presencia de genes específicos de tumor entre los pacientes a la mitad del tratamiento (T1) y al finalizar el tratamiento (T2). Se observó que *Ki67*, *BCL6*, *BCL10* y *CK19* disminuyen su frecuencia. La frecuencia de *TWIST1* y *hTERT* se mantuvieron de la misma manera en T1 y T2 y la frecuencia de *MAGE-A3* aumento 3%. Nuevamente *Ki67* fue el biomarcador con mayor frecuencia (13%) (Tabla 13).

Tabla 13. Frecuencia de expresión de biomarcadores en pacientes con LDCBG a la mitad (T1) y al final (T2) del tratamiento.

Biomarcador	Mitad del tratamiento (Sobre expresión/presencia) n (%)	Final del tratamiento (Sobre expresión/presencia) (%)
<i>KI67</i>	7 (23)	4 (13)
<i>BCL6</i>	3 (10)	1 (3)
<i>BCL10</i>	4 (13)	2 (7)
<i>CK19</i>	6 (20)	2 (7)
<i>VEGFR1</i>	2 (7)	2 (7)
<i>TWIST1</i>	1 (3)	1 (3)
<i>hTERT</i>	0	0
<i>MAGE-A3</i>	0	1 (3)

*Sobre expresión para el caso de *KI67*, *BCL6*, *BCL10*, *CK19* y *VEGFR1*;
Presencia para el caso de *TWIST1*, *hTERT* y *MAGE-A3*

En la Figura 32 se muestra el comportamiento de los niveles de expresión de los biomarcadores a los tres tiempos (T0, T1 y T2) comparados con los niveles de expresión de los individuos sanos.



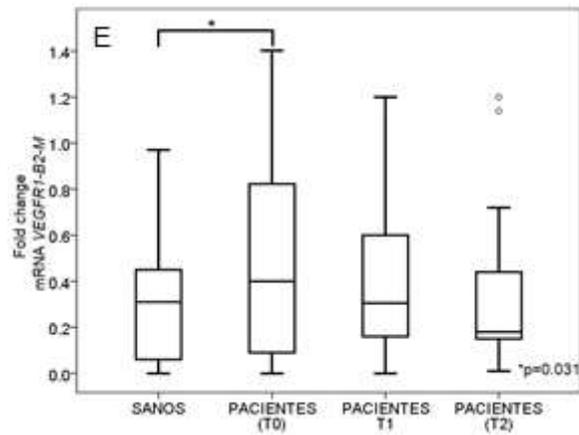


Figura 32. Determinación de los niveles de expresión de los biomarcadores en individuos sanos y pacientes con LDCBG al diagnóstico (T0), a la mitad (T1) y al final (T2) del tratamiento. (A) *KI67*, (B) *BCL6*, (C) *BCL10*, (D) *CK19*, (E) *VEGFR1* en individuos sanos y pacientes.

9.11 Co-expresión de biomarcadores en pacientes con LDCBG a la mitad (T1) y al final (T2) del tratamiento.

Después de analizar los niveles de expresión en los 30 pacientes a la mitad (T1), y al final (T2) del tratamiento, se estableció que el número máximo de biomarcadores co-expresados a T1 es de 3. Consecutivamente, se determinó el número de biomarcadores co-expresados en los pacientes al final (T2) del tratamiento (Tabla 14).

Tabla 14. Frecuencia de co-expresión de biomarcadores en pacientes con LDCBG a la mitad (T1) y al final (T2) del tratamiento

No. De genes co-expresados	Mitad del tratamiento n (%)	Final del tratamiento n (%)
0	16 (53)	20 (67)
1	7 (23)	7 (23)
2	5 (17)	3 (10)
3	2 (7)	-

A la par, se observó que 53% (16/30) de los pacientes a la mitad del tratamiento (T1) no expresaron ningún biomarcador. Por su parte, 23% (7/30) expresaron solo un biomarcador, 17% (5/30) de los pacientes expresaron 2 biomarcadores y 7% (2/30) expresaron 3 biomarcadores (número mayor de biomarcadores expresados). En la co-expresión de 2 biomarcadores se encontró que la combinación más frecuente fue *KI67 - BCL10* y *BCL6 - CK19* con 7% (2/30), respectivamente. Por su parte, en dos pacientes (7%) se encontró la misma combinación de sobre expresión de 3 genes (*BCL6 - CK19 - VEGFR1*).

Consecutivamente, se observó que 67% (20/30) de los pacientes no expresaron biomarcador alguno al finalizar su esquema de tratamiento (T2), 23% (7/30) expresaron solo un biomarcador y 10% (3/30) de los pacientes expresaron 2 biomarcadores (mayor número de biomarcadores expresados), Se determinó que existe co-expresión de biomarcadores a T2, encontrando en dos pacientes (7%) la misma combinación de 2 genes (*KI67 - VEGFR1*) y en uno más *CK19 - MAGE-A3*. Los biomarcadores co-expresados a T1 se comportaron como se muestra en la Tabla 15.

Tabla 15. Descripción de los biomarcadores co-expresados a T1 y a T2

No. De genes co-expresados	Biomarcadores co-expresados a T1	Biomarcadores co-expresados a T2
2	<i>KI67, BCL10 (2)</i>	<i>KI67, VEGFR1 (2)</i>
	<i>BCL6, CK19 (2)</i>	
	<i>BCL10, CK19</i>	<i>CK19, MAGE-A3</i>
3	<i>BCL6, CK19, VEGFR1 (2)</i>	

Por último, se encontró que la mayoría de pacientes con niveles de expresión normales de *BCL6* a T1 tuvieron un PET de final de tratamiento sin actividad tumoral, mientras que en 2/3 (66%) de los casos con expresión elevada de *BCL6* resultaron ser refractarios al esquema de tratamiento R-CHOP. A su vez, se encontró que los pacientes con sobre expresión de *BCL6* o expresión de *TWIST1* en T2, resultaron con actividad metabólica tumoral en el PET de final del tratamiento, lo que se traduce a la refractariedad del mismo. Estos resultados resaltan la importancia de la determinación del panel de biomarcadores, no solo al diagnóstico, sino también tanto a la mitad como al final del tratamiento y en la integración de pruebas para el seguimiento de los pacientes con LDCBG.

10. DISCUSIÓN

En LDCBG, la determinación de factores pronósticos se basa en hallazgos clínicos, de imagenología, inmunohistoquímicos y citogenéticos. Sin embargo, las nuevas herramientas diagnósticas/pronósticas en cáncer, emergen con las llamadas “biopsias líquidas” de sangre periférica, que han surgido como nuevas alternativas no invasivas en el estudio de pacientes con neoplasias malignas. En estas se han identificado biomarcadores circulantes (celulares y moleculares), derivados de los tumores primarios; dentro de los que destacan las CTCs, principales responsables de los casos de enfermedad metastásica.² En años recientes se ha estudiado el valor clínico de las CTCs como biomarcadores asociados con el diagnóstico, pronóstico, estratificación, detección de blancos para el tratamiento y monitoreo del mismo.³¹⁻³³ Si bien, en la actualidad la detección de CTCs sigue representando un desafío en el campo de la investigación en cáncer, en 2004 se aprobó por la FDA el método para la identificación de CTCs denominado CellSearch. No obstante, diversos procedimientos han sido descritos para su estudio, donde el enriquecimiento por medio de gradiente de densidad y la detección mediante pruebas moleculares son metodologías aprobadas por diversos grupos de estudio para la caracterización de éstas. Ambas técnicas fueron empleadas en la realización del presente estudio.^{6,15}

En diversos tipos de cáncer como el de mama⁶³, colon⁶⁴, próstata⁶⁵, pulmonar⁶⁶, de vejiga⁶⁷, páncreas⁶⁸, cabeza y cuello⁶⁹, de ovario⁷⁰ y hepatocelular⁷¹ se ha asociado la presencia de CTCs con un pronóstico desfavorable para los pacientes. Cristofanilli y colaboradores en 2006 reportaron que pacientes con cáncer de mama (cáncer más frecuente en mujeres), positivas para la detección de CTCs tuvieron una SG menor en comparación con las pacientes con ausencia de las mismas (2.1 meses vs 9.5 meses), al igual que menor SLE (4.9 meses vs 9.5 meses), resultados similares a lo reportado por Hayes y colaboradores en 2013 en el mismo tipo de cáncer.^{72,73} En cáncer de próstata (cáncer más frecuente en hombres), De Bono y colaboradores en 2008⁷⁴ reportaron la presencia de CTCs como un factor predictivo independiente con fuerte impacto en la supervivencia global de los pacientes, fortaleciendo el rol pronóstico de las CTCs en este tipo de cáncer. Por otra parte, Cohen y colaboradores en 2006⁷⁵ establecieron que el número de CTCs al diagnóstico y a lo largo del tratamiento tienen impacto en la supervivencia de pacientes con cáncer color rectal metastásico, evidenciando la importancia de la detección de CTCs en el monitoreo del padecimiento a lo largo de la administración de los esquemas de tratamiento.⁷²⁻⁷³

En linfoma, neoplasia onco-hematológica más frecuente en adultos, el estudio de CTC es escaso. En LH, se ha reportado la presencia de Células Reed-Stenberg (RS), patognomónicas de dicha neoplasia, en sangre periférica de pacientes, las primeras evidencias de estos hallazgos fueron casos clínicos aislados, reportados por Ludan en 1957⁷⁶, Varadi en 1960⁷⁷, en donde se hallaron células RS

en frotis de sangre periférica. Posteriormente, Bouroncle en 1996⁷⁸ analizó 135 pacientes con LH y encontró dichas células en 37% de los pacientes, lo que se asoció a etapas avanzadas de la enfermedad y resaltando los eventos metastásicos en neoplasias hematológicas. No obstante, el impacto pronóstico de las CTCs en LH fue descrito hasta 2004 por Gharbaran y colaboradores, en donde se asoció la presencia de CTCs, identificadas mediante la detección molecular del Virus Epstein Barr (EBV, Epstein Barr Virus), con la refractariedad al esquema de tratamiento ABVD (Adriamicina, Bleomicina, Vinblastina, Dacarbacina) y a un pronóstico desfavorable.⁷⁹

Al igual que la detección de EBV, la detección de cambios en el perfil de expresión de las CTCs, en comparación con células de individuos sanos, ha sido fundamental para la detección y caracterización de las CTCs. De acuerdo a lo realizado por Hensler y colaboradores en 2016⁸⁰, en donde detectó CTCs en cáncer de mama mediante un panel de genes, nuestro grupo de estudio diseñó un panel de biomarcadores oncológicos, que comprende 5 genes que se encuentran expresados en niveles significativamente bajos en individuos sanos (*KI67*, *BCL6*, *BCL10*, *CK19*, *VEGFR1*) y 3 genes que se expresan específicamente en células cancerosas (*TWIST1*, *hTERT*, *MAGE-A3*).

El impacto clínico de este panel de biomarcadores en población de LDCBG, se evaluó en 60 pacientes con diagnóstico histopatológico y hematológico de LDCBG, de acuerdo a los criterios de la OMS. Con base en la subclasificación histopatológica se encontró al subtipo del CG en una frecuencia del 60% y los de CBA de 40%, proporción similar a la reportada en la literatura por Scott⁸¹ y colaboradores en 2015 en 344 pacientes con LDCBG. En nuestra población de estudio, posterior a la administración de 6 ciclos del esquema de tratamiento R-CHOP se encontró una tasa de respuestas completas del 77%, mientras que en 23% se observó actividad tumoral en el PET de final de tratamiento, lo cual indica la permanencia de eventos oncogénicos. Lo anterior concuerda con las tasas de respuestas completas reportadas por Coiffer y Sarkozy en 2016, en pacientes con LDCBG tratados con el mismo esquema de tratamiento. Por otra parte, la supervivencia global de nuestra población de estudio fue del 90%, similar a los datos reportados por Persky y colaboradores en 2008, en el seguimiento correspondiente a dos años.⁸¹⁻⁸³ En cuanto al subtipo histológico de los pacientes analizados, se encontró que la SLE en el grupo del CG fue superior a la del grupo de CBA (83% vs 66%), concordante con lo reportado por Lenz y colaboradores en 2008, en donde, posterior al tratamiento con el esquema R-CHOP, la SLE a 3 años es inferior en los pacientes con el subtipo de CBA que en los del CG (40% vs 75%, $p < 0.001$).⁸⁴

En cuanto a la expresión del panel de biomarcadores moleculares se refiere, se encontró sobre expresión de genes implicados en apoptosis (*BCL6*, *BCL10*), proliferación (*KI67*), degradación de matriz extracelular (*CK19*) e inducción de angiogénesis (*VEGFR1*). Así como expresión de 3 genes

específicos de tumor, *TWIST1*, *hTERT* y *MAGE-A3*, en comparación con las muestras de individuos sanos.

Asimismo, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las medias y medianas de expresión de dichos genes. Es de resaltar el hecho de que los biomarcadores con mayor frecuencia de sobre expresión resultaron ser genes implicados en proliferación (*Ki67*) y los implicados en apoptosis (*BCL6*), características que necesitan las células transformadas para el establecimiento de tumores primarios, así como su asociación con casos de cáncer metastásico.

En el presente estudio se encontró una frecuencia de sobre expresión de los biomarcadores estudiados en el 86% de los pacientes con estadios avanzados de la enfermedad (III y IV), similar a los reportado por Bidard y colaboradores en 2016 en cáncer de mama avanzado.⁸⁵

Con respecto a la expresión del panel de biomarcadores, se analizaron los genes *Ki67*, *BCL6*, *BCL10*, *CK19* y *VEGFR1*, los cuales, similar a lo reportado en la literatura por Cordone⁸⁶, Green⁸⁷, You⁸⁸ y Suzuki⁸⁹ se encontraron expresados de manera basal en las células mononucleares de individuos sanos, utilizando las técnicas de RT-qPCR y citometría de flujo. Sin embargo, los niveles de expresión de estos marcadores se encontraron aumentados en los pacientes con LDCBG al diagnóstico T0, en comparación con los individuos sanos. Posteriormente se llevó a cabo el análisis de resultados de cada uno de los biomarcadores.

El marcador de proliferación *Ki67* ha sido estudiado como un atractivo factor pronóstico en diversos tipos de neoplasias como carcinoma renal, de mama, vejiga, pulmonar, cervical y linfoma. *Ki67* se ha asociado con pronóstico desfavorable en pacientes que presentan expresión elevada de dicho marcador, reflejada en la reducida sobrevida global de estos. En el caso del LDCBG, se ha encontrado que la expresión de *Ki67* (inmunohistoquímica) en más del 70% de células tumorales está asociada a una sobrevida global reducida. Sin embargo, su rol en la detección de células tumorales circulantes ha sido descrito solo en cáncer de mama, en donde, posterior a la detección de CTCs mediante el sistema CellSearch, se encontró expresión de *Ki67* en 50% de las CTCs, asociándolas con metástasis a cerebro en esta patología.⁹⁰ Ahora bien, similar a lo reportado por Cordone y colaboradores en 1992⁸⁶, nuestro grupo de estudio determinó el rango de expresión normal de *Ki67* en individuos sanos, con el objetivo de definir de manera precisa la diferencia entre los niveles de expresión de las células normales y las neoplásicas en proliferación. Con base en esto se determinó una frecuencia de sobre expresión de *Ki67* de 48% (29/60). De hecho, *Ki67* fue el biomarcador con la mayor frecuencia de expresión elevada y cuyos niveles de expresión correlacionaron con la infiltración de células cancerosas en sitios extranodales, similar a lo reportado por Zheng y colaboradores en 2010 en cáncer colo-rectal, en donde los niveles de expresión elevada de *Ki67* se asociaron con metástasis a órganos distales y por ende con un comportamiento clínico adverso.⁹¹

El gen *BCL6*, importante marcador implicado en resistencia a la apoptosis e inhibidor de la respuesta en daño a DNA, se ha encontrado sobre expresado en linfoma y en diversos tipos de cáncer como neuroblastoma, mama y pulmón, entre otros, se ha asociado con un pronóstico desfavorable.⁹¹ En nuestra investigación, se encontraron niveles de sobre expresión de éste en 28% (17/60) de los pacientes con LDCBG al diagnóstico (T0). A su vez, se encontró asociación entre los niveles de sobre expresión y un desenlace clínico desfavorable, evidenciado por la defunción de dichos pacientes ($p=0.012$). Si bien es conocido el rol del proto-oncogen *BCL6* en la regulación del desarrollo de células B, en los ensayos *in vitro* realizados por Phan y Dalla-Favera en 2004, se demostró que *BCL6* contribuye directamente a la represión de los genes supresores de tumor *P53*, *P21* y de la proteína pro-apoptótica PUMA, impidiendo de esta manera el arresto del ciclo celular y promoviendo la resistencia a la apoptosis en las células tumorales, facilitando la expansión clonal de éstas.⁹² Por otra parte, en leucemias de linaje B, se ha demostrado que la sobre expresión de *BCL6* en células tumorales funciona como un mecanismo de retroalimentación de supervivencia que permite que las células leucémicas sean resistentes al tratamiento, debido a la disminución de la apoptosis que debiera ser causada en respuesta al daño de DNA originado por los fármacos quimioterapéuticos.^{93,94}

En cuanto a la expresión del gen *CK19*, marcador que ha sido utilizado para la detección de células de fenotipo epitelial (similar al fenotipo de las CTCs), y del cual se han encontrado niveles de expresión elevada tanto en pacientes con cáncer de mama como con linfoma, se identificó en la población analizada en este estudio una frecuencia de sobre expresión de 20%, llamando la atención el hecho de que la mayor parte de la población que presentó sobre expresión (6/11 pacientes) correspondían a la población con estadio clínico más avanzado (IV). Sin embargo, la sobre expresión de *CK19* se encontró también en estadios tempranos de la enfermedad (I y II), similar a lo reportado por Park y colaboradores en 2017, en donde mediante la misma técnica de detección utilizada en este estudio (RT-qPCR) encontraron expresión de *CK19* en pacientes con cáncer de mama tanto en estadios tempranos (I y III), como en estadios avanzados (III), a lo cual se le ha atribuido el rol de evento iniciador de metástasis (en estadios tempranos), y marcador ya caracterizado en la liberación de CTCs a partir del tumor primario en los casos de cáncer de mama.⁹⁵

Con respecto a la expresión de *VEGFR1*, se identificaron muestras de pacientes con LDCBG con sobre expresión de este gen. De igual manera, *VEGFR1* se ha encontrado sobre expresado en diversos tipos de cáncer como colo-rectal, pulmonar, renal, glioblastoma, mama y gástrico. La sobre expresión de éste ha sido asociada con angiogénesis y linfangiogénesis tumoral y con elevadas tasas de invasión, lo que representa un pronóstico adverso en pacientes que la presenten. Si bien su rol en CTCs no ha sido descrito, en neoplasias hematológicas Gratzinger y colaboradores en 2007 detectaron, mediante inmunohistoquímica, sobre expresión de los miembros de la familia VEGF,

incluidos VEGF-A, VEGFR1 y VEGFR2 en ganglio linfático de LDCBG, tanto en el subtipo GC como en el ABC, sin hallar diferencias significativas entre ambos subtipos, similar a lo encontrado en nuestra investigación.⁹⁶ Por otra parte, en el presente estudio, al igual que Brademeier en 2017, se encontraron niveles de expresión elevados del gen *VEGFR1* en comparación con células de individuos sanos. Sin embargo, no se encontró relación entre la sobre expresión de *VEGFR1* y los parámetros clínicos analizados, ni con la sobrevida de los mismos, similar a lo reportado por Jorgensen y colaboradores en 2009. No obstante, un dato a resaltar es la sobre expresión de *VEGFR1* en 45% de los casos en donde se presentaron sitios extranodales infiltrados por células de linfoma ($p=0.296$), lo cual concuerda con la premisa de que la expresión de receptores de factores de crecimiento es fundamental en la inducción de angiogénesis y linfangiogénesis, requeridas para el crecimiento y migración de las células originadas del tumor primario.^{97,98}

La expresión de genes específicos de tumor, está asociada con el fenotipo de células transformadas malignas, ya que su expresión está restringida a células cancerosas. Los miembros de este grupo de genes que se estudiaron fueron *TWIST1*, *hTERT* y *MAGE-A3*. El factor de transcripción *TWIST1*, involucrado en la etapa de embriogénesis y reactivado en carcinogénesis, conduce a la Transformación Epitelio-Mesenquimal. La expresión de *TWIST1*, reprime la expresión de moléculas como E-cadherina, exhibiendo su función en los procesos de invasión y metástasis; así como en los procesos de inducción de angiogénesis, proliferación, y resistencia al tratamiento mediada por la inducción de la expresión de los transportadores de drogas ABC (ABC, ATP Binding Cassete). La determinación de este gen específico de tumor es de suma importancia, pues se ha asociado su presencia en tumores de cáncer de mama, próstata, pulmón y melanoma con una sobrevida global reducida en comparación con los pacientes que no presentan expresión del mismo. A su vez, se ha utilizado la detección de *TWIST1* en la detección de CTCs en cáncer de mama, principalmente. En nuestro estudio, el gen *TWIST1* se encontró expresado en circulación en 28% de los casos de LDCBG con estadios clínicos avanzados (III y IV); es decir, en presencia de sitios extranodales infiltrados por células tumorales, siendo el gen específico de tumor con mayor frecuencia de expresión en la población analizada. Otro punto a destacar sobre la expresión de *TWIST1*, es que se encontró expresado en el 35% de los casos de LDCBG refractario. Si bien, en nuestro análisis de correlación no se encontraron datos estadísticamente significativos ($p=0.484$), se encontraron datos similares a los reportados por Wu y colaboradores, en donde se asoció la expresión de *TWIST1* con una tasa elevada de refractariedad al tratamiento en cáncer de ovario, debido a la quimioresistencia al tratamiento y resistencia a la apoptosis mediada por *TWIST1*, al ser factor de transcripción del gen *MDR-1*, principal causa de resistencia al tratamiento en cáncer.⁹⁹

Otro de los genes específicos de tumor que se detectaron en circulación sanguínea de los pacientes con LDCBG, fue la telomerasa *hTERT*, la cual participa en la inmortalización de células progenitoras

y de igual manera en las células cancerosas de diversos tipos de tumores. En linfomas se ha encontrado que el LDCBG es el segundo subtipo de LNH en el que se expresa este gen (solo detrás del Linfoma de Burkitt), y su actividad se ha relacionado con tasas elevadas de proliferación tumoral mediadas por la activación del gen *MYC*. Su expresión ha permitido detectar CTCs en cáncer de pulmón, y se ha asociado con un pronóstico desfavorable en estos pacientes. Lo anterior es similar a lo obtenido por nuestro grupo de estudio, en donde, a pesar de la baja frecuencia de *hTERT* en circulación sanguínea (3%), los pacientes que la presentaron tuvieron la sobrevida global más baja de la totalidad de los pacientes analizados (5.4 y 5.8 meses, respectivamente).²⁴

Adicionalmente, dentro de los antígenos específicos de tumor estudiados en diversos tipos de cáncer están los miembros de la familia de los ATC, los cuales se expresan específicamente en tejido embrionario, espermatoцитos y ovogonia, en donde inducen proliferación y resistencia a la apoptosis; pero que se encuentran silenciados en el resto de las estirpes celulares mediante procesos epigenéticos de metilación. La expresión aberrante de los genes que codifican para los ATCs, ha sido descrita en diversos tipos de cáncer como melanoma, cáncer de ovario, pulmón, colon, páncreas, y en neoplasias onco-hematológicas como leucemia, mieloma múltiple y linfomas. En numerosos estudios se ha asociado la expresión de diversos miembros de la familia ATC, como *MAGE-A3*, con pronóstico adversos en pacientes que presentan la expresión de este en tumor primario. En LDCBG, Olarte y colaboradores en 2011 reportaron la asociación de la expresión de *MAGE-A3* con una sobrevida global corta, así como con los estadios avanzados de la enfermedad, expresándose en mayor cantidad en pacientes con estadios III y IV, que en estadios tempranos I y II. A su vez, la expresión aberrante de *MAGE-A3* se ha utilizado para la identificación de CTCs en diversos tipos de cáncer como el melanoma cutáneo, cáncer de pulmón y de mama, en donde se ha demostrado su impacto pronóstico adverso y su correlación con el grado de metástasis, cuando se detecta en conjunto con otros miembros de la familia *MAGE*, como *MAGE-A2*, *MAGE-A4* y *MAGE-A6*. En estos tipos de cáncer, la expresión de *MAGE-A3* en CTCs va desde un 10% hasta un 17%, frecuencia mayor a la determinada en nuestro estudio, en donde la frecuencia de expresión resultó de únicamente 3%. En un estudio realizado por Han y colaboradores en 2009, se encontró una frecuencia de expresión de *MAGE-A3* en LNH de 47.3%, frecuencia por demás elevada en comparación con la obtenida en nuestro estudio. Esta discrepancia puede ser debido a que la población analizada en el estudio mencionado comprende las variedades LDCBG, linfoma de células T y NK/T, linfoma de células del manto, linfoma de Burkitt y linfoma folicular. Es de suma importancia mencionar que a pesar de la alta tasa de expresión de *MAGE-A3* en CTCs de LNH encontrada en el estudio, no se encontró asociación con parámetros clínicos como género, linaje celular, estado funcional, estadios de la enfermedad, presencia de sitios extranodales, IPI e infiltración a médula ósea, ni con la sobrevida de los pacientes; datos similares a lo obtenido por nuestro grupo.^{27, 100}

El análisis de supervivencia de Kaplan Meier mostró que los pacientes con subtipo tanto del CG como de CBA, con niveles de sobre expresión de *BCL6* en sangre periférica al diagnóstico, presentaron una menor sobrevida global y libre de eventos, en comparación con aquellos que presentaron niveles normales de expresión de este gen, independientemente del subtipo de LDCBG que presentó cada paciente.

Consecutivamente, se realizó el seguimiento de 30 de los 60 pacientes con LDCBG con el estudio de sus respectivas muestras biológicas a T1 y a T2 (mitad y final del tratamiento), con el fin de integrar una herramienta mínimamente invasiva al estudio de su padecimiento. Se determinó que la frecuencia de sobre expresión de prácticamente todo el panel de biomarcadores (excepto *CK19*), disminuyó de T0 a T1 (posterior a 3 ciclos de tratamiento), y subsecuentemente de T1 a T2 (posterior a los 6 ciclos de tratamiento). Nuestros datos son similares a lo reportado por Sharma en 2009, en donde resaltan la importancia de disminuir los niveles de los biomarcadores tumorales como parte de la evaluación de la respuesta a la terapia posterior a la administración del esquema de tratamiento en pacientes con cáncer testicular y linfoma. Si bien, las CTCs no son los biomarcadores circulantes que se utilizan por excelencia en linfomas para monitorizar el progreso del tratamiento, en el presente estudio se determinaron niveles de sobre expresión a T1 de al menos un biomarcador del panel analizado en 47% (14/30) de la población estudiada. Dentro de estos, el 29% (4/14) presentaron un PET de mitad de tratamiento sin disminución de la actividad metabólica tumoral de base; es decir, con tendencia a ser refractarios al tratamiento. Cabe mencionar que el 45% (4/9) de los pacientes que presentaron PET de intervalo con actividad tumoral tuvieron al menos un biomarcador sobre expresado al T1, y aunque este hallazgo no tuvo significancia estadística ($p=0.873$), se encontraron pacientes con sobre expresión de *BCL6* a T1 y a T2, en los cuales se encontró relación con actividad tumoral metabólica progresiva. El 66% (2/3) de los pacientes con expresión elevada de *BCL6* no lograron remisión del padecimiento a T1; de igual manera, el único paciente con sobre expresión de *BCL6* a T2 presentó PET de final de tratamiento con actividad tumoral ($p=0.042$). Aunado a esto, resaltar el hecho de que el 50% (3/6) de los pacientes con actividad tumoral en el PET de final de tratamiento presentaron sobre expresión de algún gen del panel de biomarcadores estudiados. Estos datos concuerdan con el estudio realizado por De Giorgi y colaboradores en 2010, donde se analizaron 102 pacientes con cáncer de mama a las que se les monitoreó en el transcurso del tratamiento con la prueba de PET, aunado a la detección de CTCs mediante el sistema CellSearch. En este estudio, el 67% de las pacientes analizadas presentaban concordancia entre la presencia de CTCs y la detección de actividad tumoral en su respectivo PET.¹⁰¹

11. CONCLUSIONES

Se encontró sobre expresión de los transcritos de *BCL6*, *BCL10*, *KI67*, *CK19*, *VEGFR1*, *TWIST1* y *MAGE A-3* en pacientes con LDCBG a T0, T1 y T2.

Se encontraron diferencias significativas entre las medias de expresión de los genes, *BCL6*, *BCL10*, *KI67*, *CK19*, *VEGFR1*, entre los pacientes al diagnóstico y los individuos sanos.

No se encontraron diferencias significativas entre las medias de expresión de los biomarcadores al T1 ni a T2, debido a la normalización en los niveles de expresión.

Se encontró una asociación entre los niveles de expresión elevada del marcador de proliferación *KI67* al diagnóstico T0 y la infiltración de sitios extranodales por células tumorales, evidenciados por el PET inicial.

Se estableció que los pacientes al diagnóstico (T0) que presentaron niveles de sobre expresión de *BCL6* tuvieron sobrevida global y libre de eventos menor en comparación con los pacientes con expresión normal del mismo, resaltando su relevancia como potencial biomarcador al diagnóstico.

Se demostró que la sobre expresión de *BCL6* al diagnóstico (T0) puede ser un biomarcador de pronóstico adverso que impacta en la sobrevida, tanto en pacientes con LDCBG del CG como de CBA.

La expresión de *hTERT* a T0 puede ser considerado como un biomarcador con impacto en la SG de los pacientes con LDCBG.

Se determinó que los pacientes a T1 y T2 que tuvieron niveles de expresión elevada de *BCL6* resultaron refractarios al esquema de tratamiento R-CHOP, resaltando la importancia de la determinación de este biomarcador en el transcurso del tratamiento.

Se encontró sobre expresión de los genes del panel de biomarcadores (excepto *hTERT*) en pacientes al finalizar el tratamiento (T2), hallazgo que concuerda con el resultado de PET de final de tratamiento con actividad metabólica tumoral.

12. PERSPECTIVAS

Validar los resultados obtenidos en un estudio clínico prospectivo independiente.

Continuar con la evaluación de los niveles de expresión de los biomarcadores metastásicos en biopsias líquidas de pacientes con LDCBG para seguir evaluando el alcance pronóstico de dicho panel, tanto al diagnóstico como en el transcurso del esquema de tratamiento.

Extender la captación de muestras de pacientes con LDCBG en cualquier etapa del tratamiento para ampliar la población de estudio y confirmar la significancia estadística obtenida en el presente estudio.

Extender el tiempo de seguimiento de los pacientes analizados para renovar el análisis de correlación de los biomarcadores expresados con sus condiciones clínicas actuales.

Extrapolar la evaluación del panel de biomarcadores metastásicos a pacientes con otras variantes de Linfoma

13. LITERATURA CITADA

1. Zhang, C., Guan, Y., Sun, Y., *et al.* (2016). Tumor heterogeneity and circulating tumor cells. *Cancer Lett.* 374 (2), 216-23.
2. Masuda, T., Hayashi, N., Iguchi, T., *et al.* (2016). Clinical and biological significance of circulating tumor cells in cancer. *Mol Oncol.* 10 (3), 408-17.
3. Asworth, T. (1869). A case of cancer in which cells similar to those in tumors were seen in the blood after death. *Aust Med J.* 14, 146-149.
4. Ribatti, D., Mangialardi, G., Vacca, A. (2006). Stephen Paget and the “seed and soil” theory of metastatic dissemination. *Clin ExperMed*, 6, 145–9.
5. Morán, E., Rodríguez, J., Lara, M., *et al.* (2014). Células tumorales circulantes en cáncer de mama: un posible riesgo biológico. *Rev de Especialidades Médico-Quirúrgicas*; 19 (1), 45-51.
6. Thiele, J., Bethel, K., Králíčková, M., *et al.* (2017). Circulating Tumor Cells: Fluid Surrogates of Solid Tumors. *Annu Rev Pathol*, 12, 419-447.
7. Iakovlev, V., Goswami, R., Vecchiarelli, J., *et al.* (2007). Quantitative detection of circulating epithelial cells by Q-RT-PCR. *Breast Cancer Research and Treatment*, 107, 145–54.
8. Ruiz, C., Li, J., Luttgren, S., *et al.* (2015). Limited Genomic Heterogeneity of Circulating Melanoma Cells in Advanced Stage Patients. *Physical Biology*, 12 (1), 016008.
9. Chang, L., Asatrian, G., Dry, S., James, A. (2015). Circulating tumor cells in sarcomas: a brief review. *Med Oncol*, 32 (1), 430.
10. Talmadge, J., Fidler, I. (2010). AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective. *Cancer research*, 70 (14), 5649-69.
11. Hanahan, D., Weinberg, R. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144 (5), 646-74.
12. Hong, Y., Fang, F., Zhang, Q. (2016). Circulating tumor cell clusters: What we know and what we expect (Review). *Int J Oncol*, 49 (6), 2206-2216.
13. Gharbaran, R., Park, J., Kim, C., *et al.* (2014). Circulating tumor cells in Hodgkin's lymphoma - a review of the spread of HL tumor cells or their putative precursors by lymphatic and hematogenous means, and their prognostic significance. *Crit Rev Oncol Hematol*, 89 (3), 404-17.
14. Panabières, C., Pantel, K. (2013). Circulating tumor cells: liquid biopsy of cancer. *Clin Chem*, 59 (1), 110-8.
15. Yap, T., Lorente, D., Omlin, A., *et al.* (2014). Circulating tumor cells: a multifunctional biomarker. *Clin Cancer Res*, 20 (10), 2553-68.
16. Hensler, M., Vančurová, I., Becht, E., *et al.* (2015). Gene expression profiling of circulating tumor cells and peripheral blood mononuclear cells from breast cancer patients. *Oncoimmunology*, 5 (4), e1102827
17. Broyde, A., Boycov, O., Strenov, Y., *et al.* (2009). Role and prognostic significance of the Ki-67 index in non-Hodgkin's lymphoma. *Am J Hematol*, 84 (6), 338-43
18. Huang, J., Xia, Y., Wang, Y., *et al.* (2016). A comparison of R-EPOCH and R-CHOP as a first-line regimen in de novo DLBCL patients with high Ki-67 expression in a single institution. *Oncotarget*, 7 (27), 41242–41250.
19. Shustik, J., Han, G., Farinha, P., *et al.* (2010). Correlations between BCL6 rearrangement and outcome in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with CHOP or R-CHOP. *Haematologica*, 95 (1), 96-101.
20. Chen, J., Tang, D., Wang, S., *et al.* (2014). High expressions of galectin-1 and VEGF are associated with poor prognosis in gastric cancer patients. *Tumour Biol*, 35 (3), 2513-9.
21. Gratzinger, D., Zhao, S., Marinelli, R., *et al.* (2007). Microvessel density and expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in diffuse large B-cell lymphoma subtypes. *Am J Pathol*, 170 (4), 1362-9
22. Vieites, B., López, M., Castilla, C., *et al.* (2016). CK19 expression in breast tumours and lymph node metastasis after neoadjuvant therapy. *Histopathology*, 69 (2), 239-49.
23. Tang, B., Xie, R., Qin, Y., *et al.* (2016). Human telomerase reverse transcriptase (hTERT) promotes gastric cancer invasion through cooperating with c-Myc to upregulate heparanase expression. *Oncotarget*, 7 (10), 11364-79.

24. Klapper, W., Krams, M., Qian, W., *et al.* (2003). Telomerase activity in B-cell non-Hodgkin lymphomas is regulated by hTERT transcription and correlated with telomere-binding protein expression but uncoupled from proliferation. *Br J Cancer*, 89 (4), 713-9.
25. Caballero, O., Chen, Y. (2009). Cancer/testis (CT) antigens: Potential targets for immunotherapy. *Cancer Sci*, 100 (11), 2014-21.
26. Baylin, S. (2005). DNA methylation and gene silencing in cancer. *Nat Clin Pract Oncol*, 2 (1) 1:S4-11.
27. Olarte, I., Martinez, A., Ramos, C., *et al.* (2011). MAGE-A3 expression is an adverse prognostic factor in diffuse large B-cell lymphoma. *Hematology*, 16 (6), 368-72.
28. Hong, B., Zu, Y. (2013). Detecting circulating tumor cells: current challenges and new trends. *Theranostics*, 3 (6), 377-94.
29. Wallwiener, M., Hartkopf, A., Baccelli, I., *et al.* (2013). The prognostic impact of circulating tumor cells in subtypes of metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 137 (2), 503-10.
30. Bayarri, C., Ortega, F., Cueto, A., *et al.* (2016). Circulating Tumor Cells Identify Early Recurrence in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer Undergoing Radical Resection. *PLoS One*, 11 (2), e0148659
31. Lu, S., Tsai, W., Chang, Y., *et al.* (2016). Identifying cancer origin using circulating tumor cells. *Cancer Biol Ther*, 17 (4), 430-8.
32. Paluchowski, M., Krawczyk, N., Fehm, T. (2016). Potential Role of Circulating Tumor Cell Detection and Monitoring in Breast Cancer: A Review of Current Evidence. *Frontiers in Oncology*, 6, 255.
33. Krebs, M., Hou, J., Ward, H., *et al.* (2010). Circulating tumour cells: their utility in cancer management and predicting outcomes. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, 2 (6), 351–365.
34. Hatton, C., Collins, G., Sweetenhan, J. (2014). Fast Facts: Lymphoma. Roche. 2ed. 9-17
35. Swerdlow, S., Campo, E., Harris, N., *et al.* (2017) WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues (Revised 4th edition). IARC: Lyon
36. Anderson, J., Armitage, J., Weisenburger, D. (1998). Epidemiology of the non-Hodgkin's lymphomas: distributions of the major subtypes differ by geographic locations. Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *Ann Oncol*, 9 (7), 717-20.
37. Labardini, J., Cervera, E., Corrales, C., *et al.* (2011). Oncogúa: Linfoma No Hodgkin. *Cancerología*, 139 – 152
38. Beltran, B., Castillo, J., Morales, D., *et al.* (2011). EBV-positive diffuse large B-cell lymphoma of the elderly: a case series from Peru. *Am J Hematol*, 86 (8), 663-7.
39. Testoni, M., Zucca, E., Young, K., *et al.* (2015). Genetic lesions in diffuse large B-cell lymphomas. *Ann Oncol*, 26 (6), 1069-80
40. Basso, K., Dalla-Favera, R. (2015). Germinal centres and B cell lymphomagenesis. *Nat Rev Immunol*, 15 (3), 172-84
41. Madrigal, M., Aviles, A., Mayani, H. (2004). El linfoma difuso de células grandes: nuevos enfoques moleculares. *Rev Inv Clin*, 56 (4), 483-494
42. Guía práctica clínica IMSS 174-09. Linfoma no Hodgkin en el adulto, <http://www.cvsp.cucs.udg.mx/guias>
43. Li, S., Young, K., Medeiros, L. Diffuse large B-cell lymphoma. *Pathology*, 50 (1), 74-87.
44. Lichtman, M., Kaushansky, K., Kipps, T. *et al.* (2011). Williams. Manual de Hematología. Mc. Graw Hill. Cap 61, 457-467.
45. Coiffier, B., Lepage, E., Briere, J., *et al.* (2002). CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med*, 346 (4), 235-42.
46. Sehn, L., Berry, B., Chhanabhai, M., *et al.* (2007). The revised International Prognostic Index (R-IPI) is a better predictor of outcome than the standard IPI for patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *Blood*, 109 (5), 1857-61.
47. Takahashi, H., Tomita, N., Yokoyama, M., *et al.* (2012). Prognostic impact of extranodal involvement in diffuse large B-cell lymphoma in the rituximab era. *Cancer*, 118 (17), 4166-72
48. Castillo, J., Winer, E., Olszewski, A. (2014). Sites of extranodal involvement are prognostic in patients with diffuse large B-cell lymphoma in the rituximab era: an analysis of the Surveillance, Epidemiology and End Results database. *Am J Hematol*, 89 (3), 310-4.
49. Lenz, G., Wright, G., Emre, N., *et al.* (2008). Molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma arise by distinct genetic pathways. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105, (36), 13520-5.

50. Choi, W., Weisenburger, D., Greiner, T., *et al.* (2009). A new immunostain algorithm classifies diffuse large B-cell lymphoma into molecular subtypes with high accuracy. *Clin Cancer Res*, 15 (17), 5494-502
51. Hans, C., Weisenburger, D., Greiner, T., *et al.* (2004). Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood*, 103 (1), 275-82.
52. Scott, D., Mottok, A., Ennishi, D., *et al.* (2015). Prognostic Significance of Diffuse Large B-Cell Lymphoma Cell of Origin Determined by Digital Gene Expression in Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissue Biopsies. *J Clin Oncol*, 33 (26), 2848-56
53. Barrans, S., Crouch, S., Smith, A., *et al.* (2010). Rearrangement of MYC is associated with poor prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated in the era of rituximab. *J Clin Oncol*, 28 (20), 3360-5.
54. Savage, K., Johnson, N., Ben-Neriah, S., *et al.* (2009). MYC gene rearrangements are associated with a poor prognosis in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with R-CHOP chemotherapy. *Blood*, 114 (17), 3533-7.
55. Green, T., Nielsen, O., de Stricker, K., *et al.* (2012). High levels of nuclear MYC protein predict the presence of MYC rearrangement in diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Surg Pathol*, 36 (4), 612-9
56. Klapper, W., Stoecklein, H., Zeynalova, S., *et al.* (2008). Structural aberrations affecting the MYC locus indicate a poor prognosis independent of clinical risk factors in diffuse large B-cell lymphomas treated within randomized trials of the German High-Grade Non-Hodgkin's Lymphoma Study Group (DSHNHL). *Leukemia*, 22 (12), 2226-9
57. Iqbal, J., Sanger, W., Horsman, D., *et al.* (2004). BCL2 translocation defines a unique tumor subset within the germinal center B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Pathol*, 165 (1), 159-66
58. van Imhoff, G., Boerma, E., van der Holt, B., *et al.* (2006). Prognostic impact of germinal center-associated proteins and chromosomal breakpoints in poor-risk diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol*, 24 (25), 4135-42
59. Jacobson, M., Burne, J., King, M., *et al.* (1993). Bcl-2 blocks apoptosis in cells lacking mitochondrial DNA. *Nature*. 28, 361 (6410), 365-9.
60. Yunis, J., Mayer, M., Arnesen, M., *et al.* (1989). Bcl-2 and other genomic alterations in the prognosis of large-cell lymphoma. *N Engl J Med*. 20 (16), 1047-54.
61. Petrich, A., Nabhan, C., Smith, S. (2014). MYC-associated and double-hit lymphomas: a review of pathobiology, prognosis, and therapeutic approaches. *Cancer*, 120 (24), 3884-95.
62. Pemmaraju, N., Gill, J., Gupta, S., & Krause, J. R. (2014). Triple-hit lymphoma. *Proceedings. Baylor University. Medical Center*, 27 (2), 125-127.
63. Moussavi-Harami, S., Wisinski, K., Beebe D. (2014). Circulating Tumor Cells in Metastatic Breast Cancer: A Prognostic and Predictive Marker. *J Patient Cent Res Rev*, 1 (2), 85-92.
64. Eliasova, P., Pinkas, M., Kolostova, K., *et al.* (2017). Circulating tumor cells in different stages of colorectal cancer. *Folia Histochem Cytobiol*, 55 (1), 1-5.
65. Wang, F., Yang, X., Yang, S., *et al.* (2011). A higher number of circulating tumor cells (CTC) in peripheral blood indicates poor prognosis in prostate cancer patients--a meta-analysis. *Asian Pac J Cancer Prev*, 12 (10), 2629-35
66. Tong, B., Xu, Y., Zhao, J., *et al.* (2017). Prognostic significance of circulating tumor cells in non-small cell lung cancer patients undergoing chemotherapy. *Oncotarget*, 8 (49), 86615-86624
67. Zhang, Z., Fan, W., Deng, Q., *et al.* (2017). The prognostic and diagnostic value of circulating tumor cells in bladder cancer and upper tract urothelial carcinoma: a meta-analysis of 30 published studies. *Oncotarget*, 8 (35), 59527-59538.
68. Pimienta, M., Edderkaoui, M., Wang, R., & Pandol, S. (2017). The Potential for Circulating Tumor Cells in Pancreatic Cancer Management. *Frontiers in Physiology*, 8, 381.
69. McMullen, K., Chalmers, J., Lang, J., *et al.* (2016). Circulating tumor cells in head and neck cancer: A review. *World Journal of Otorhinolaryngology - Head and Neck Surgery*, 2 (2), 109-116.
70. Zhou, Y., Bian, B., Yuan, X., *et al.* (2015). Prognostic Value of Circulating Tumor Cells in Ovarian Cancer: A Meta-Analysis. *PLoS ONE*, 10 (6), e0130873.
71. Fan, J. L., Yang, Y. F., Yuan, C. H., *et al.* (2015). Circulating Tumor Cells for Predicting the Prognostic of Patients with Hepatocellular Carcinoma: A Meta Analysis. *Cell Physiol Biochem*, 37 (2), 629-40
72. Cristofanilli, M. (2006). Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *Semin Oncol*, 33 (3 Suppl 9), S9-14.

73. Hayes, D. F., Paoletti, C. (2013). Circulating tumour cells: insights into tumour heterogeneity. *J Intern Med*, 274 (2), 137-43

74. de Bono, J. S., Scher, H. I., Montgomery, R. B., (2008). Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res*, 14 (19), 6302-9.
75. Cohen, S. J., Alpaugh, R. K., Gross, S., et al. (2006). Isolation and characterization of circulating tumor cells in patients with metastatic colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer*, 6 (2), 125-32.
76. Ludman, H., Spear, W. (1957). Reed-Sternberg cells in the peripheral blood; report of case of Hodgkin's disease. *Blood*, 12 (2), 189-92.
77. Varadi, S. (1960). Reed—Sternberg Cells in the Peripheral Blood and Bone-marrow in Hodgkin's Disease. *British Medical Journal*, 1 (5181), 1239–1243.
78. Bouroncle, B. A. (1996). Sternberg–Reed cells in the peripheral blood of patients with Hodgkin's disease. *Blood*, 27, 544–556.
79. Gharbaran, R., Park, J., Kim, C., et al. (2014). Circulating tumor cells in Hodgkin's lymphoma - a review of the spread of HL tumor cells or their putative precursors by lymphatic and hematogenous means, and their prognostic significance. *Crit Rev Oncol Hematol*, 89 (3), 404-17.
80. Hensler, M., Vančurová, I., Becht, E., et al. (2016). Gene expression profiling of circulating tumor cells and peripheral blood mononuclear cells from breast cancer patients. *Oncoimmunology*, 5 (4), e1102827.
81. Scott, D. W., Wright, G. W., Williams, P. M., et al. (2014). Determining cell-of-origin subtypes of diffuse large B-cell lymphoma using gene expression in formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *Blood*, 123(8), 1214–1217.
82. Coiffier, B., Sarkozy, C. (2016). Diffuse large B-cell lymphoma: R-CHOP failure-what to do? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2 (1), 366-378.
83. Persky, D. O., Unger, J. M., Spier, C.M., et al. (2008). Phase II study of rituximab plus three cycles of CHOP and involved-field radiotherapy for patients with limited-stage aggressive B-cell lymphoma: Southwest Oncology Group study 0014. *J Clin Oncol*, 26 (14), 2258-63.
84. Lenz, G., Wright, G., Emre, N., et al. (2008). Molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma arise by distinct genetic pathways. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105 (36), 13520–13525.
85. Bidard, F. C., Proudhon, C., Pierga, J.Y. (2016). Circulating tumor cells in breast cancer. *Mol Oncol*, 10 (3), 418-30.
86. Cordone, I., Matutes, E., Catovsky, D. (1992). Monoclonal antibody Ki-67 identifies B and T cells in cycle in chronic lymphocytic leukemia: correlation with disease activity. *Leukemia*, 6 (9), 902-6.
87. Green, M. R., Dueñas, C., Romero, I., et al. (2014). Transient expression of Bcl6 is sufficient for oncogenic function and induction of mature B-cell lymphoma. *Nature Communications*, 5, 3904.
88. You, F., Roberts, L. A., Kang, S. P., et al (2008). Low-level expression of HER2 and CK19 in normal peripheral blood mononuclear cells: relevance for detection of circulating tumor cells. *J Hematol Oncol*, 28, 1:2.
89. Suzuki, K., Hayashi, N., Miyamoto, Y., et al. (1996). Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*, 56 (13):3004-9.
90. Lindsay, C. R., Le Moulec, S., Billiot, F., et al. (2016). Vimentin and Ki67 expression in circulating tumour cells derived from castrate-resistant prostate cancer. *BMC Cancer*, 16, 168.
91. Zheng, Y., Wang, L., Zhang, J. P., et al. (2010). Expression of p53, c-erbB-2 and Ki67 in intestinal metaplasia and gastric carcinoma. *World J Gastroenterol*, 16 (3), 339-44.
92. Phan, R. T., Dalla-Favera, R. (2004). The BCL6 proto-oncogene suppresses p53 expression in germinal-centre B cells. *Nature*, 432 (7017), 635-9.
93. Duy, C., Hurtz, C., Shojaee, S., et al. (2011). BCL6 enables Ph+ acute lymphoblastic leukaemia cells to survive BCR-ABL1 kinase inhibition. *Nature*, 473 (7347):384-8.
94. Tahara, K., Takizawa, M., Yamane, A., et al. (2017). Overexpression of B-cell lymphoma 6 alters gene expression profile in a myeloma cell line and is associated with decreased DNA damage response. *Cancer Sci*, 108 (8), 1556-1564.
95. Park, H. S., Han, H. J., Lee, S., et al. (2017). Detection of Circulating Tumor Cells in Breast Cancer Patients Using Cytokeratin-19 Real-Time RT-PCR. *Yonsei Med J*, 58 (1), 19-26.
96. Gratzinger, D., Advani, R., Zhao, S., et al. (2010). Lymphoma cell VEGFR2 expression detected by immunohistochemistry predicts poor overall survival in diffuse large B cell lymphoma treated with immunochemotherapy (R-CHOP). *British Journal of Haematology*, 148 (2), 235–244.
97. Bredemeier, M., Edimiris, P., Mach, P., et al. (2017). Gene Expression Signatures in Circulating Tumor Cells Correlate with Response to Therapy in Metastatic Breast Cancer. *Clin Chem*, 63 (10), 1585-1593

98. Jørgensen, J. M., Sørensen, F. B., Bendix, K., *et al.* (2009). Expression level, tissue distribution pattern, and prognostic impact of vascular endothelial growth factors VEGF and VEGF-C and their receptors Flt-1, KDR, and Flt-4 in different subtypes of non-Hodgkin lymphomas. *Leuk Lymphoma*, 50 (10), 1647-60
99. Wu, Y. H., Huang, Y. F., Chang, T. H., Chou, C. Y. (2017). Activation of TWIST1 by COL11A1 promotes chemoresistance and inhibits apoptosis in ovarian cancer cells by modulating NF- κ B-mediated IKK β expression. *Int J Cancer*, 141 (11), 2305-2317.
100. Han, M. H., Eom, H. S., Park, W. S., *et al.* (2010). Detection of circulating lymphoma cells in patients with non-Hodgkin lymphoma using MAGE-A3 gene expression in peripheral blood. *Leuk Res*, 34 (9), 1127-31.
101. De Giorgi, U., Valero, V., Rohren, E., *et al.* (2009). Circulating tumor cells and [18F]fluorodeoxyglucose positron emission tomography/computed tomography for outcome prediction in metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*, 27 (20), 3303-11.



AMIINSHAE

**La Asociación Mexicana de Investigadores de los
Institutos Nacionales de Salud y Hospitales de Alta Especialidad. A.C.
otorga la presente constancia a:**

**Cerón Maldonado R , Martínez Tovar Adolfo , Ramos Peñafiel CO , Garcia Laguna A , De la Cruz
Rosas A , Salas Mendoza I, Kassack Ipiña JJ, Olarte Carrillo Irma**

Por su valiosa participación en la sesión de carteles con el trabajo

**Determinación de los niveles de expresión de biomarcadores
metastásicos en células tumorales circulantes de pacientes con
Linfoma Difuso de Células Grandes B**

**3er. Congreso de la AMIINSHAE
23 y 24 de noviembre de 2017**

Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía

**Dr. Vicente Madrid Marina
Presidencia Colegiada**

**Dr. Víctor Rafael Coria Jiménez
Comité Organizador**



La Agrupación Mexicana para el Estudio de la Hematología, AC.

Tiene el honor de entregar la presente

CONSTANCIA

a:

Rafael Cerón Maldonado¹, Adolfo Martínez Tovar¹, Christian Omar Ramos Peñañel², Laila Gutiérrez Kobeh³, María Isabel Soto Cruz⁴, Iveth Mendoza Salas¹, Anel Irais García Laguna¹, Adrián De la Cruz Rosas¹, Enríque Miranda Peraltal, Juan Collazo Jaloma⁵, Efreén Horacio Montaña Figueroa⁶, Emma Mendoza García⁵, Irma Olarte Carrillo¹

1 Laboratorio de Biología Molecular. Servicio de Hematología. Hospital General de México. Dr. Eduardo Liceaga; 2 Unidad de Hospitalización. Servicio de Hematología. Hospital General de México; 3 Facultad de Medicina. UNAM; 4 Facultad de Estudios Superiores. Zaragoza; 5 Laboratorio de Hematología Especial. Servicio de Hematología. Hospital General de México; 6 Clínica de Linfomas. Servicio de Hematología. Hospital General de México

Por su participación con el trabajo en presentación en Cartel:

"Análisis de la expresión de biomarcadores metastásicos en células tumorales circulantes de pacientes con Linfoma Difuso de Células Grandes B"

Presentado en el "LIX" Congreso Anual de la Agrupación, evento realizado del 25 al 29 de abril de 2018, en Nuevo Vallarta, México

Atentamente,

Dra. Adolfin Bergés García
Presidenta

Dr. Carlos Martínez Murillo
Vocal de Acts. Académicas

Agrupación Mexicana para el Estudio de la Hematología AC.

San Francisco del Rio, Toluca (Deputación), C.P. 1241000, México. Dirección: C.P. 011100 Cuauhtémoc, México.
Tel. + 52 (570) 2521 1112 • Fax + 52 (570) 5334 1010
www.amebh.org • contact@amebh.org

Mesa Directiva
Dr. Luis Sánchez Arellano
Fundador
Dra. Adolfin Bergés García
Presidenta
Dr. César Hernández Zamudio
Vicepresidenta
Dra. Mtl. Antonieta Velez Rueda
Secretaria
Dra. M. Patricia Orjuela Martínez
Reservada
Dr. Carlos Martínez Murillo
Vocal de Acts. Académicas
Dra. Mtl. Luisa de la Rosa Casas
Vocal de Administración



La Agrupación Mexicana para el Estudio de la Hematología, AC.

Tiene el honor de entregar la presente

CONSTANCIA

a:

Rafael Cerón Maldonado¹, Adolfo Martínez Tovarl, Christian Omar Ramos Peñañel², Laila Gutiérrez Kobeh³, María Isabel Soto Cruz⁴, Iveth Mendoza Salas¹, Anel Irais García Lagunas¹, Adrián De la Cruz Rosas¹, Enrique Miranda Peralta¹, Juan Collazo Jalomas⁵, Efreem Horacio Montañó Figueroa⁶, Emma Mendoza García⁵, Irma Olarte Carrillo¹

1 Laboratorio de Biología Molecular. Servicio de Hematología. Hospital General de México. Dr. Eduardo Liceaga; 2 Unidad de Hospitalización. Servicio de Hematología. Hospital General de México; 3 Facultad de Medicina. UNAM; 4 Facultad de Estudios Superiores. Zaragoza; 5 Laboratorio de Hematología Especial. Servicio de Hematología. Hospital General de México; 6 Clínica de Linfomas. Servicio de Hematología. Hospital General de México

Por su participación con el trabajo en presentación en Cartel:

“Expresión de BCL-6 en Células Tumorales Circulantes de pacientes con Linfoma Difuso de Células Grandes B”

Presentado en el “LIX” Congreso Anual de la Agrupación, evento realizado del 25 al 29 de abril de 2018, en Nuevo Vallarta, México

Atentamente,

Dra. Adolfin Bergés García
Presidenta

Dr. Carlos Martínez Murillo
Vocal de Acts. Académicas



Agrupación Mexicana para el Estudio de la Hematología AC.
Sede: Torre base del Hospital General de México. Ciudad de México.
Calle Doctores, s/n. Ciudad de México. C.P. 06702. Ciudad de México.
Tel: +52 (55) 5734 4114 • +52 (55) 5734 1870.
www.ameh.org • contact@ameh.org

Mesa Directiva
Dr. Luis Sánchez Mendieta
Fundador
Dra. Adolfin Bergés García
Presidenta
Dr. Oscar Hernández Zamudio
Vicepresidente
Dra. M. Antonina Viver Kuriela
Secretaría
Dra. M. Patricia Enriquez Alvarado
Tesorera
Dr. Carlos Martínez Murillo
Vocal de Acts. Académicas
Dra. M. Lucha de la Haza Cano
Vocal de Abandona



XII Congress of the Latin American Association of Immunology - ALAI

XXIII Congress of the Mexican Society of Immunology - SMI

Latin American Immunologists Fighting Disease
May 14 -18, 2018

Certificate

This is to confirm that

Cerón-Maldonado R, Martínez-Tovar A, Ramos-Peñafiel CO, Gutiérrez-Kobeh L, Soto-Cruz MI, Mendoza-Salas I, García-Laguna AI, De la Cruz-Rosas A, Miranda-Peralta E, Collazo-Jaloma J, Montaña-Figueroa EH, Mendoza-García E, Olarte-Carrillo I.

Delivered the Poster presentation:

Determination of metastatic biomarkers expression levels in Circulating Tumor Cells in Diffuse Large B Cell Lymphoma patients.

XII Congress of the Latin American Association of Immunology - ALAI

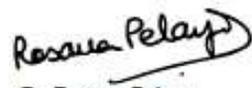
XXIII Congress of the Mexican Society of Immunology - SMI

May 14 -18, 2018

Cancún, Quintana Roo


Dr. Leopoldo Santos Argumedo
ALAI President


Dr. Humberto Lanz
ALAI Secretary


Dr. Rosana Pelayo
SMI President


Dr. Gustavo Pedraza
SMI Secretary