



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**“IMPACTO PRONÓSTICO DE LA SOBREEXPRESIÓN DE MYC, BCL2
y/o BCL6 EN PACIENTES CON LINFOMA NO HODGKIN DIFUSO DE
CÉLULAS B GRANDES”**

TESIS

**PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
ESPECIALISTA EN HEMATOLOGÍA**

PRESENTA:

KATHERINE MADELYN ROCÍO RODRÍGUEZ FUENTES

TUTORES DE TESIS:

Dr. Gilberto Israel Barranco Lampón

Dra. Irma Olarte Carrillo

COTUTORES DE TESIS:

Dr. Juan Francisco Zazueta Pozos

Dr. Carlos Martínez Murillo

Ciudad Universitaria, CD. MX. 2020



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.



Of. No. DECS/JPO-75-2019

Ciudad de México a 25 de octubre del 2019

KATHERINE MADELYN ROCIO RODRIGUEZ F.
Servicio de HEMATOLOGIA
P R E S E N T E

Hacemos de su conocimiento que con esta fecha el Comité de Tesis dictaminó la última versión de su Protocolo Titulado **"143 - Impacto pronóstico de la sobreexpresión de MYC, BCL2 y/o BCL6 en pacientes con Linfoma no Hodgkin difuso de células B grandes"**, como:

APROBADO

En caso de que su protocolo tenga el dictamen de aprobado cuenta con el siguiente número de registro:

DECS/JPO-CT-075-2019

En el caso de que su protocolo tenga dictamen de **CONDICIONADO A CORRECCIONES**, éste **NO** cuenta con número de registro y debe realizar las correcciones que se enlistan en los puntos que integran la tabla adjunta a éste documento para su consideración y en su caso, aprobación definitiva y asignación de número de registro.

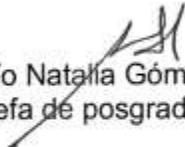
Deberá entregar la respuesta en un tiempo de 15 a 30 días vía correo electrónico y de forma impresa, a partir de la fecha de este oficio. Cabe mencionar que de no entregarlo como se indica, no será revisado por el Comité de Tesis y su protocolo será cancelado.

Si su protocolo tiene dictamen de APROBADO, haga caso omiso de las indicaciones anteriores.

Sin más por el momento, le envío un cordial saludo.

"A la Vanguardia en el Cuidado de la Vida"

ATENTAMENTE


Dra. Rocío Natalia Gómez López
Jefa de posgrado

Ccp.- Acuse
ccgr



DEDICATORIA

A mis padres, por ser los pilares de mi vida, por su apoyo incondicional en cada momento, por creer en mí y siempre darme palabras de aliento para continuar cumpliendo sueños.

A mis hermanos, por siempre darme ánimos para seguir adelante.

A mi sobrino David, por ser siempre una luz de alegría.

AGRADECIMIENTOS

A Dios y la Virgen María, por darme la oportunidad de cumplir un sueño más, porque cuando creí que esto no sería posible fueron mi guía, pero sobre todo eternamente agradecida por nunca abandonarme.

A mis maestros del Hospital General de México "Dr. Eduardo Liceaga", por la confianza depositada en mí y por formarme como Hematóloga.

A Dr. Gilberto Barranco, Dra. Irma Olarte, Dr. Juan Francisco Zazueta, Dr. Carlos Martínez Murillo, Dr. Juan José Navarrete, por la colaboración y orientación en la realización de este trabajo.

A mis compañeros: Yubelka Baltodano, Karen Pellón, Claudia Tellería, Mario Tapia, Juan Diego Muñoz; siempre los recordaré por ser parte de la Caravana Migrante.

ÍNDICE

1.	Antecedentes	8
2.	Planteamiento del Problema	17
3.	Justificación	18
4.	Hipótesis	19
5.	Objetivos	19
6.	Metodología	
	6.1 Tipo y diseño de estudio	20
	6.2 Población y tamaño de la muestra	20
	6.3 Criterios de inclusión y exclusión	22
	6.4 Definición de las variables	23
	6.5 Procedimientos	24
	6.6 Análisis Estadístico	26
7.	Resultados	26
8.	Análisis de los resultados	37
9.	Conclusiones	41
10.	Referencias bibliográficas	42
11.	Anexos	45

Impacto pronóstico de la sobreexpresión de MYC, BCL2 y/o BCL6 en pacientes con Linfoma no Hodgkin difuso de células B grandes

RESUMEN:

Antecedentes: El linfoma difuso de células B grandes (LDCBG) es el subtipo histológico más común del linfoma no Hodgkin y comprende un grupo heterogéneo de enfermedades con características morfológicas, inmunofenotípicas y moleculares variadas. Se ha informado que la sobreexpresión de MYC, BCL2 y BCL6, evaluada por inmunohistoquímica (IHC), es un factor pronóstico en el LDCBG; pero los datos no son consistentes y, a veces, contradictorios. La evaluación de la expresión de MYC, BCL2 y BCL6 por IHC representa una técnica rápida, económica y reproducible. Por lo tanto, estos representan biomarcadores relevantes que deben probarse en estudios futuros utilizando nuevos agentes para mejorar el pronóstico del LDCBG. Sin embargo, se desconocía en nuestro hospital el pronóstico en los pacientes con LDCBG que sobreexpresan MYC, BCL2 y/o BCL6.

Objetivos: El objetivo general fue evaluar el impacto pronóstico de la sobreexpresión de MYC, BCL2 y BCL6 mediante la determinación de la supervivencia global y la supervivencia libre de progresión en una cohorte retrospectiva de LDCBG. Los objetivos específicos fue la estimación de la frecuencia de pacientes que sobreexpresan MYC, BCL2 y/o BCL6, así como la correlación con factores pronóstico ya conocidos en paciente con LDCBG.

Metodología: Estudio retrospectivo y analítico, en el que se revisaron los expedientes de pacientes con diagnóstico de LDCBG con resultados de MYC ($\geq 40\%$), BCL2 ($\geq 70\%$) y/o BCL6 ($\geq 50\%$), determinados por IHC; entre enero de 2014 y diciembre de 2018. El análisis univariado de las curvas de supervivencia se calcularon de acuerdo al método de Kaplan-Meier, y las diferencias entre las curvas se evaluaron mediante la prueba de log-rank; para el análisis multivariado se utilizó el método de Cox. Y la relación entre variables se evaluó con la prueba X^2 con una significancia estadística de $p < 0.05$.

Resultados: Al analizar la sobreexpresión de MYC, BCL2 y/o BCL6 se observó que este grupo de pacientes tenían una menor supervivencia global con una media de 24 meses, estadísticamente significativa ($p=0.000$); lo mismo se observó cuando analizamos las gráficas de supervivencia libre de progresión, evidenciando que los pacientes que tenían la sobreexpresión en células neoplásicas tuvieron una media de 7.8 meses, estadísticamente menor ($p=0.000$).

Palabras Clave: MYC, BCL2, BCL6 en DLBCL: impacto pronóstico.

Prognostic impact of MYC, BCL2 and / or BCL6 overexpression in patients with diffuse large B-cell non-Hodgkin lymphoma

SUMMARY:

Background: Diffuse large B-cell lymphoma (LDCBG) is the most common histologic subtype of non-Hodgkin lymphoma and comprises a heterogeneous group of diseases with varied morphological, immunophenotypic, and molecular characteristics. Overexpression of MYC, BCL2 and BCL6, as assessed by immunohistochemistry (IHC), has been reported to be a prognostic factor in LDCBG; but the data is not consistent and sometimes contradictory. Evaluation of MYC, BCL2 and BCL6 expression by IHC represents a fast, inexpensive and reproducible technique. Therefore, these represent relevant biomarkers that should be tested in future studies using new agents to improve the prognosis of LDCBG. However, the prognosis in patients with LDCBG that overexpress MYC, BCL2 and / or BCL6 was unknown in our hospital.

Objectives: The overall objective was to assess the prognostic impact of MYC, BCL2, and BCL6 overexpression by determining overall survival and progression-free survival in a retrospective LDCBG cohort. The specific objectives were the estimation of the frequency of patients who overexpress MYC, BCL2 and / or BCL6, as well as the correlation with prognostic factors already known in patients with LDCBG.

Methodology: Retrospective and analytical study, in which the records of patients diagnosed with LDCBG with results of MYC ($\geq 40\%$), BCL2 ($\geq 70\%$) and / or BCL6 ($\geq 50\%$), determined by IHC; between January 2014 and December 2018. The univariate analysis of the survival curves were calculated according to the Kaplan-Meier method, and the differences between the curves were evaluated using the log-rank test; For the multivariate analysis, the Cox method was used. And the relationship between variables was evaluated with the X² test with a statistical significance of $p < 0.05$.

Results: When analyzing the overexpression of MYC, BCL2 and / or BCL6, it was observed that this group of patients had a lower overall survival with a mean of 24 months, statistically significant ($p = 0.000$); The same was observed when we analyzed the progression-free survival graphs, showing that the patients who had overexpression in neoplastic cells had a mean of 7.8 months, statistically lower ($p=0.000$).

Key Words: MYC, BCL2, BCL6 in DLBCL: prognostic impact.

Impacto pronóstico de la sobreexpresión de MYC, BCL2 y/o BCL6 en pacientes con Linfoma no Hodgkin difuso de células B grandes

1. ANTECEDENTES

El linfoma difuso de células B grandes (LDCBG) presenta diversas morfologías, inmunofenotipos, aberraciones genéticas y cursos clínicos. Estas características varían según las regiones geográficas, lo que sugiere que la heterogeneidad geográfica es una característica de este tipo de linfoma. El LDCBG constituye el 31-34% de todos los linfomas no Hodgkin en los países occidentales, más del 40% en los países asiáticos y el 45.8% en China. En México el LDCBG representa el 48% del total de linfomas [1,2].

Se ha confirmado que el Índice de pronóstico internacional (IPI) (tabla 1), y el IPI revisado (R-IPI) que pueden definir nuevos grupos de riesgo en pacientes tratados con rituximab; y son pronosticadores válidos para pacientes que reciben quimioterapia estándar [3]. Sin embargo, existen diferencias considerables en el resultado dentro de cada uno de los grupos de riesgo, lo que sugiere diferencias biológicas subyacentes que no están abarcadas por los factores de riesgo de la escala IPI [4]. Además, el perfil de la expresión génica ha estratificado al LDCBG en subtipos moleculares pronósticos diferentes según la célula de origen, incluidos los de tipo centro germinal de células B (GCB), subtipos de célula B activados y LDCBG sin clasificar [5,6]. Sin embargo, estos subtipos no predicen de manera confiable el pronóstico de los pacientes individuales [7].

Tabla 1. Índice Pronóstico Internacional (IPI)

Factor de riesgo	Puntuación
Edad < 60 años	0
Edad \geq 60 años	1
DHL sérica \leq 1x valor normal	0
DHL sérica > 1x valor normal	1
ECOG 0, 1	0
ECOG 2-4	1
Estadio Clínico I, II	0
Estadio Clínico III, IV	1
Invasión extranodal \leq 1 sitio	0
Invasión extranodal > 1 sitio	1

Grupo de riesgo	Puntuación	SG a 5 años (%)	SLP a 5 años (%)
Bajo	0, 1	73	70
Intermedio bajo	2	51	50
Intermedio alto	3	43	49
Alto	4, 5	26	40

Diversos grupos [8] han propuesto una subdivisión inmunofenotípica de LDCBG, no especificada de otra manera (NOS, por sus siglas en inglés) en subgrupos de células B (centro germinal y no centro germinal) como predictor de pronóstico. Sin embargo, en algunos estudios, esta subdivisión inmunofenotípica no se correlaciona con el pronóstico [9,10], y actualmente no determina la terapia [11].

Estudios anteriores informaron el mal pronóstico de los reordenamientos de MYC y BCL2 y/o BCL6 en el LDCBG, conocido como linfoma de doble hit (DHL) o linfoma de triple hit (THL), detectada mediante el uso de técnicas citogenéticas de hibridación fluorescente in situ (FISH). En 2016, la revisión de la Organización Mundial de la Salud (OMS) de la clasificación del linfoma definió esto como una nueva categoría de linfoma de células B de alto grado [12], el cual se presenta en menos del 10% de pacientes con LDCBG. En comparación, la sobreexpresión de las proteínas MYC y BCL2 y/o BCL6, los llamados linfomas doble expresores (DE) o los triple expresores (TE), detectados por IHC, que son mucho más comunes y se presentan en el 20-30% de pacientes con LCCBG [13].

Además, estudios recientes proporcionan evidencia convincente de que una población de LDCBG caracterizada por la coexpresión de las proteínas MYC y BCL2, identificada por IHC tienen un mal pronóstico con la inmunoterapia estándar con rituximab, ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisona (R-CHOP) [14-16]. Más recientemente, Heike et al., informaron que una combinación de IHC y FISH predicen el resultado en pacientes con LDCBG independientemente del IPI después del tratamiento con R-CHOP. La correlación entre la sobreexpresión de proteínas MYC, BCL2 y/o BCL6 y las translocaciones génicas, como biomarcadores en el diagnóstico y pronóstico del LDCBG, sugieren que la sobreexpresión de proteínas de MYC, BCL2 y BCL6 se correlacionan positivamente

con su translocación génica; entonces, la sobreexpresión de la proteína MYC, BCL2, BCL6 sugiere la posibilidad de translocación. Por lo tanto, la detección inmunohistoquímica de MYC, BCL2 y BCL6 son útiles en el diagnóstico y pronóstico de LDCBG [17] .

1.1 Sobreexpresión de la proteína MYC, BCL2 y BCL6

La sobreexpresión de la proteína MYC se produce en el 29-47% de los casos de LDCBG, independientemente de la presencia de reordenamiento de MYC, y el pronóstico es particularmente malo si está sobreexpresión de MYC se acompaña de la sobreexpresión de la proteína BCL2 [8,18,20,21]. Aunque la expresión de la proteína MYC se produce en casi la mitad de los casos de LDCBG, el número de células positivas varía ampliamente, y el valor pronóstico depende de cómo se define la sobreexpresión de MYC a través de inmunohistoquímica (es decir, el límite para el porcentaje de células positivas a MYC). Generalmente, se utiliza un corte de mayor o igual al 40% de células positivas para definir la sobreexpresión de MYC, $\geq 70\%$ para BCL2 y $\geq 50\%$ para BCL6 [10].

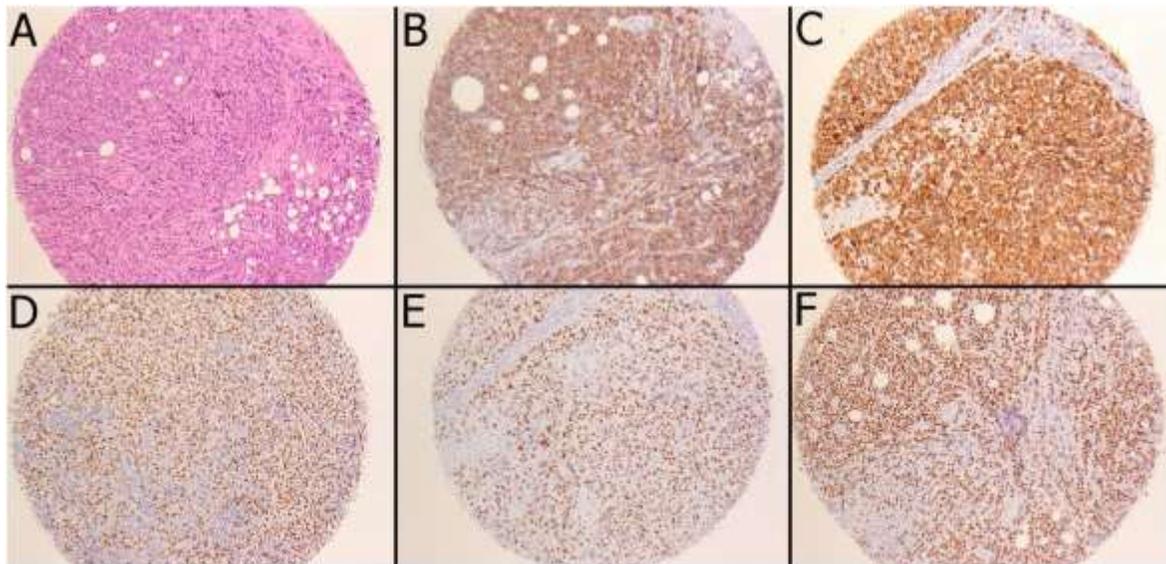


Figura 1. Sobreexpresión de proteínas en DLBCL medida por inmunohistoquímica. Los patrones de tinción MYC-, BCL6- y p53 son nucleares, mientras que CD20 muestra patrones de tinción citoplasmática membranosa y BCL2. (A) Tinción con hematoxilinaosina. (B–F) Tinciones inmunohistoquímicas (B) CD20. (C) BCL2. (D) BCL6. (E) MYC. (F) p53.

1.2 Presentación clínica

Los pacientes con sobreexpresión de MYC, BCL2 y/o BCL6 no tienen una presentación clínica específica [11,19]. Sin embargo, varios estudios informan una mayor frecuencia de esta entidad en estadios III/IV, compromiso de la médula ósea, aumento de lactato deshidrogenasa (LDH), enfermedad extranodal que incluye compromiso del SNC y una mayor puntuación en el Índice de pronóstico internacional (IPI) en los pacientes con LDCBG que sobreexpresan MYC, BCL2 y/o BCL6 determinada por IHC [3,19,20].

1.3 Resultado clínico

Johnson et al. [22] demostraron que la coexpresión de MYC y BCL2 y/o BCL6, pero no la sobreexpresión de MYC sola, se asocia con una peor supervivencia global en pacientes con LDCBG. En el análisis multivariado, el resultado fue significativamente peor para la supervivencia global, pero no para la supervivencia libre de progresión, y fue independiente del IPI y de la célula de origen.

Hu y sus colegas, mostraron que los pacientes con linfoma que sobreexpresan MYC, BCL2 y/o BCL6, a los que se les administró R-CHOP también tuvieron una tasa de respuesta completa más baja, una supervivencia global y una supervivencia libre de progresión más corta a los 5 años que los pacientes sin esta sobreexpresión. Este mal resultado de la sobreexpresión de MYC, BCL2 y/o BCL6 fue independiente de los subtipos de origen de la célula, la puntuación de IPI, la presencia de síntomas de células B y la presencia de mutación TP53. Además, los linfomas difuso de células B grandes que sobreexpresa MYC, BCL2 y/o BCL6 tienen una marcada predilección por el subtipo histológico de linfocito B activadas, sin embargo este subtipo histológico ya no está asociado con una supervivencia global inferior o una supervivencia libre de progresión después de excluir todos los casos de linfomas que tiene doble expresión, es decir, sobreexpresión MYC, BCL2 y/o BCL6 [23].

1.4 Estrategias de tratamiento

El mal resultado de los linfomas doble y triple expresores está relacionado con la refractariedad a la quimioterapia. Sin embargo, algunos pacientes que logran una respuesta completa después del tratamiento de primera línea logran tiempos de supervivencia global sustanciales después de alcanzar esta respuesta completa, que debería ser el objetivo final [24].

Los linfomas que sobreexpresan MYC, BCL2 y/o BCL6 pueden tener diferentes mecanismos patológicos en comparación con los linfomas doble y triple hit. Para linfomas doble hit, las alteraciones genéticas inducen la proliferación y la pérdida de control de los genes homeostáticos. Por lo tanto, apuntar a las rutas de MYC y BCL2 podría controlar con éxito la proliferación e inducir la capacidad de respuesta a los agentes terapéuticos. Por el contrario, los pacientes con linfomas doble expresores que pueden no tener alteraciones genéticas en MYC y BCL2, pero sí tienen una sobreexpresión de proteínas, lo que sugiere que están involucradas vías alternativas y que se requiere la inhibición terapéutica de estas vías alternativas.

1.5 R-CHOP en pacientes con Linfoma doble expresor de novo

Aunque es mejor que CHOP solo, el régimen de R-CHOP no parece dar resultados satisfactorios en todas las series de linfomas doble y triple hit. Johnson y colegas [25] demostraron que, para 11 pacientes con linfoma doble hit que recibieron R-CHOP, la supervivencia global promedio fue de 1.4 años, en comparación con 0.4 años para los pacientes que recibieron CHOP. Oki y colegas [26] demostraron que, para 57 (45%) de 127 pacientes con linfoma doble hit que recibieron R-CHOP, solo 23 (41%) pacientes obtuvieron una respuesta completa, una proporción mucho menor que la de la LDCBG clásica, y supervivencia libre de progresión y la supervivencia general fueron solo del 25% y del 41%, respectivamente.

Para los pacientes con doble expresión, la supervivencia general a los 5 años fue del 36% y la supervivencia libre de progresión a los 5 años fue del 32%, en

comparación con el 71% y el 65%, respectivamente, para los pacientes con LDCBG clásica. [22, 27] Perry y sus colegas [23] informaron un riesgo de muerte que fue nueve veces mayor para los pacientes con linfomas doble expresores que para los pacientes con LDCBG sin doble expresión a los que se les administró R-CHOP.

Con respecto al riesgo de enfermedad del SNC , un estudio [28] mostró que la profilaxis intratecal reduce el riesgo de desarrollar enfermedad del SNC a los 3 años, y otro grupo mostró además que el metotrexato intravenoso en dosis altas es más eficiente que la profilaxis intratecal; por lo tanto, se recomienda la introducción de dos ciclos de metotrexato en dosis altas después de una estrategia basada en rituximab más doxorubicina [29]

1.6 Estrategias intensivas en Linfoma doble expresor de novo

Un estudio [30] ha demostrado que el rituximab y el etopósido, prednisona, vincristina y doxorubicina dosis ajustado (DA-EPOCH-R), un régimen intensivo, proporcionan resultados comparables para pacientes con LDCBG que tuvieron reordenamientos de MYC (supervivencia libre de progresión durante 4 años, 83% frente al 76%). Además, este régimen también mejora el resultado en pacientes con linfoma doble hit en comparación con el tratamiento con R-CHOP [31], con una tasa de respuesta completa más alta (68% frente a 40%), mayor supervivencia libre de progresión (67% frente a 25% a los 2 años; 67% frente a 20% a los 3 años), y una supervivencia general más prolongada (76% frente a 41% a los 2 años; 76% frente a 35% a los 3 años).

Petrich y sus colegas [32] demostraron que 64 pacientes que recibieron DA-EPOCH-R tuvieron una mejor supervivencia general y libre de progresión que 100 pacientes que recibieron R-CHOP. Además, otros regímenes intensivos, como R-hyperCVAD (rituximab más ciclofosfamida hiperfraccionada, vincristina, doxorubicina y dexametasona) o R-CODOX-M/IVAC (rituximab más ciclofosfamida, doxorubicina, metotrexate, citarabina) tienen mayores tasas de respuesta completa y una supervivencia más larga sin progresión que R-CHOP [33]. Sin

embargo, hasta ahora estos análisis han sido retrospectivos y, por lo tanto, tienen limitaciones inherentes que comprometen las conclusiones definitivas.

Los pacientes con linfoma de doble expresores, que se caracteriza por reordenamientos de MYC y BCL2 o BCL6, enfrentan pronósticos deficientes. Además, el impacto de los factores clínicos basales, la terapia de inducción y el trasplante de células madre en los resultados de 311 pacientes con linfoma doble expresor sin tratamiento previo. En la mediana de seguimiento de 23 meses, la mediana de supervivencia libre de progresión y las tasas de supervivencia general entre todos los pacientes fueron de 10,9 y 21,9 meses, respectivamente. Cuarenta por ciento de los pacientes permanecen libres de enfermedad y 49% permanecen vivos a los 2 años. La inducción intensiva se asoció con una mejor SLP, pero no con la SG, y el trasplante de células madre hematopoyéticas no se asoció con una mejor OS entre los pacientes que lograron la primera remisión completa ($p= 0.14$). Mediante el análisis multivariante, la etapa avanzada, la afectación del sistema nervioso central, la leucocitosis y la DHL > 3 veces el límite superior de la normalidad se asoció con un mayor riesgo de muerte. Y, por lo tanto, un subconjunto de pacientes de con linfoma doble expresor puede curarse, y algunos pacientes pueden beneficiarse de la inducción intensiva [39].

1.7 Desarrollo de nuevos agentes

1.7.1 Agentes dirigidos a la expresión de las proteínas MYC, BCL2 y BCL6:

No hay datos disponibles sobre la eficacia de fármacos como la lenalidomida y los inhibidores de BTK que atacan los subtipos de LDCBG (es decir, células B activadas o células del centro germinal) en pacientes con sobreexpresión de MYC, BCL2 y/o BCL6. La proteína de choque térmico H1/105 (HSPH1) es una chaperona que se sobreexpresa en LDCBG, y su expresión está asociada con la expresión de MYC y la agresividad del linfoma. La desactivación de HSPH1 indujo la regulación negativa de MYC, BCL2 y BCL6 e inhibió la proliferación de células de linfoma y disminuyó la neoangiogénesis en un modelo de ratón con linfoma [23].

La familia BCL2 también representa un objetivo para los linfomas doble expresores. Navitoclax (ABT-263), un inhibidor de BCL2, mostró actividad anticancerosa en un ensayo de fase 1 de pacientes con neoplasias malignas linfoides, pero se informaron toxicidades con trombocitopenia grave [34]. Venetoclax (ABT-199), un inhibidor de BCL2 diseñado para reducir la toxicidad plaquetaria, mostró una actividad antitumoral prometedora en un modelo de xenoinjerto de LDCBG (un ensayo de fase 1, NCT01594229, está en marcha) e impresionantes tasas de respuesta y supervivencia libre de progresión en pacientes con leucemia linfocítica crónica [35], pero se informó resistencia que podría estar relacionada con la expresión de MCL1, un gen objetivo de MYC que codifica un regulador apoptótico que es importante en la supervivencia de células de linfoma de células B positivas para MYC [29]. La selección de rutas de PI3K / AKT / mTOR reduce la expresión de MCL1 y actúa de forma sinérgica con ABT-737, disminuyendo así la posible resistencia. Los inhibidores de la quinasa dependiente de ciclina (CDK) también se pueden usar para apuntar a MCL1 [30]. Dinaciclib, un inhibidor de CDK en la fase 1 y 2 en el desarrollo del mieloma múltiple y la leucemia linfocítica crónica (NCT01515176), se dirige a CDK9 y se ha demostrado que tiene actividad preclínica en líneas celulares y modelos de ratón [36]. La actividad de venetoclax se ha validado en líneas celulares de DHL y THL, y la administración conjunta de venetoclax y JQ1 suprimió en gran medida el crecimiento de las células THL [34]. Los inhibidores de BCL6 han mostrado una actividad preclínica prometedora en los modelos LDCBG [35] y podrían ser útiles para MYC - BCL6 DHL.

Otras terapias dirigidas al metabolismo del cáncer dependiente de MYC también podrían usarse en linfomas doble y triple hit, así como doble y triple expresores. Se están desarrollando agentes dirigidos al metabolismo de la glucosa, que se regula al alza en las células que sobreexpresan MYC. Un ejemplo de tal agente es AZD3965, un inhibidor específico del transportador de monocarboxilato (MCT1), que causa la acumulación de lactato, disminuye el pH celular e inhibe la glucólisis y el crecimiento del linfoma en ratones. AZD3965 se está probando en un ensayo de fase 1 (NCT01791595) para detectar LDCBG y otros cánceres sólidos.

La expresión aberrante de la proteína MYC induce la expresión de aurora quinasas A y B, y el análisis de los datos del proyecto de perfil molecular de linfoma/leucemia mostró que la expresión de estas quinasas está asociada con la expresión de MYC y BCL2 en LDCBG. En un modelo de ratón con LDCBG agresivo que coexpresa MYC y BCL2, la combinación del inhibidor de la aurora quinasa alisertib con rituximab y vincristina indujo letalidad sintética y una posible cura [35].

MYC también se expresa en otras neoplasias malignas sólidas, y se han estudiado nuevos agentes dirigidos a la vía o expresión de MYC en estos tipos de tumores [37]. AZD1208, un inhibidor de la PIM (una quinasa que se ha vinculado a la tumorigénesis inducida por MYC), se ha investigado en un modelo de ratón para el cáncer de próstata en el que indujo inhibición de la proliferación y apoptosis [38].

Para desarrollar y evaluar nuevas terapias, se ha desarrollado un nuevo modelo de ratón de DHL MYC - BCL2 humanizado que recapitula los aspectos patológicos y clínicos de la DHL humana resistente a la quimioterapia y al rituximab [39].

2. PLATEAMIENTO DEL PROBLEMA

La sobreexpresión de la proteína MYC se produce en el 29-47% de los casos de LDCBG, independientemente de la presencia de reordenamiento de MYC, y el pronóstico es particularmente malo si esta sobreexpresión de MYC se acompaña de la sobreexpresión de la proteína BCL2 y/o BCL6.

Desde hace 20 años, se observó que el pronóstico adverso de la sobreexpresión de MYC empeoraba cuando coexiste con la sobreexpresión de BCL2 (es decir, en la doble expresión). Además, es importante destacar que el linfoma doble expresor es más común que los doble y triple hit, y es diferente, aunque el 80 a 90% de los pacientes con linfoma doble o triple hit también expresan tanto MYC como BCL2. Los pacientes con LDCBG doble y triple expresores muestran una escasa supervivencia frente a los regímenes de tratamiento actuales. BCL2, una proteína anti apoptótica, es otro factor crítico para la supervivencia de las células del linfoma y su sobreexpresión se asocia con muchas neoplasias malignas linfoides con resistencia terapéutica. Por ello, existe la necesidad de mejores modalidades de tratamiento para abordar este desafío clínico no cumplido. Aún con el mejor tratamiento disponible, y a pesar de contar con escalas de riesgo certeras, una cantidad importante de pacientes presentan enfermedad refractaria, recaída o muerte por linfoma.

Por lo tanto, es importante realizar más investigaciones de la sobreexpresión de MYC, BCL2 y/o BCL6 las cuales se relacionan con el comportamiento biológico del linfoma, ayudando a mejorar los factores pronósticos establecidos hoy en día.

Preguntas de Investigación:

¿Cuál es la supervivencia global y supervivencia libre de progresión en los pacientes con LDCBG que tienen la sobreexpresión de MYC, BCL2 y/o BCL6 diagnosticados en el Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga”?

3. JUSTIFICACIÓN

Los linfomas difusos de células B grandes con aberraciones en MYC, BCL2 y/o BCL6 por alteraciones genéticas o determinado por la sobreexpresión de proteínas, representan un grupo de linfomas de células B de alto grado con resultados inferiores cuando se tratan con quimioterapia estándar como el esquema R-CHOP. Como resultado, se han sugerido regímenes de inducción intensificados en un esfuerzo por mejorar los resultados de estos pacientes.

La refractariedad de la quimio-inmunoterapia es problemática y las tasas de recaída son altas. Los pacientes con linfoma que sobreexpresan MYC, BCL2 y/o BCL6 parecen tener un mayor riesgo de afectación del sistema nervioso central. Sin embargo, no hay pruebas suficientes disponibles hasta la fecha para recomendar energicamente a favor o en contra del trasplante de células madre hematopoyéticas en esta población. Por lo tanto, se necesitarán ensayos clínicos para establecer un régimen terapéutico preferido y un estándar de atención adecuado en este grupo único de pacientes con LDCBG.

El mal pronóstico de los pacientes con LDCBG tratados con CHOP cuyos tumores presentan sobreexpresiones de MYC, BCL2 y/o BCL6 está bien establecido. Más recientemente, el impacto pronóstico negativo de las translocaciones de MYC también se ha confirmado en pacientes tratados con R-CHOP.

Por esta razón consideramos necesario evaluar si la sobreexpresión de MYC, BCL2 y/o BCL6 en linfomas no Hodgkin difuso de células B grandes, de los pacientes tratados en el Hospital General de México "Dr. Eduardo Liceaga", se asociaba a una disminución en la supervivencia global y supervivencia libre de enfermedad, o a los factores de mal pronóstico ya conocidos (edad, escala ECOG, estadio clínico, invasión extranodal, elevación de DHL, subtipo histológico).

4. HIPÓTESIS

La supervivencia global y supervivencia libre de progresión en los pacientes con linfoma no Hodgkin difuso de células B grandes que sobreexpresan MYC, BCL2 y/o BCL6 al diagnóstico, es inferior a la supervivencia global y supervivencia libre de progresión de los pacientes que no sobreexpresan estas proteínas.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General:

- Determinar la supervivencia global y supervivencia libre de progresión en los pacientes con diagnóstico de linfoma no Hodgkin difuso de células B grandes que sobreexpresan MYC, BCL2 y/o BCL6, diagnosticados en el Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga”

5.2 Objetivos Específicos:

- Identificar la incidencia de los pacientes con linfoma no Hodgkin difuso de células grandes B tratados en el Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga” que sobreexpresan MYC, BCL2 y/o BCL6.
- Evaluar la asociación entre la sobreexpresión de MYC, BCL2 y/o BCL6 con la edad, elevación de la deshidrogenasa láctica, escala ECOG, estadio clínico, invasión extranodal en pacientes con linfoma no Hodgkin difuso de células B grandes tratados en el Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga”.
- Evaluar la asociación entre la sobreexpresión de MYC, BCL2 y/o BCL6 y el subtipo histológico de linfoma no Hodgkin difuso de células grandes B en pacientes tratados en el Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga”.

6. METODOLOGÍA

6.1 Tipo y diseño de estudio:

Retrospectivo, analítico, observacional, transversal.

6.2 Población:

Se revisaron los expedientes clínicos de pacientes con diagnóstico de linfoma no Hodgkin difuso de células B grandes, y se seleccionaron a los pacientes que contaban con reporte de Inmunohistoquímica compatible con la sobreexpresión de MYC ($\geq 40\%$), BCL2 ($\geq 70\%$ y/o BCL6 ($\geq 50\%$); diagnosticados entre enero de 2014 a diciembre de 2018 en el Hospital General de México "Dr. Eduardo Liceaga".

6.3 Tamaño de la muestra:

El tamaño de la muestra se determinó utilizando el programa G*Power 3.1.9.2 para determinar la potencia estadística. Para el cálculo de χ^2 se utilizaron las Pruebas de bondad de ajuste. Cálculo del tamaño de muestra requerida:

Parámetros de entrada:

Tamaño del efecto $w = 0.3$

Error α probable = 0.05

Poder $1-\beta$ (error probable) = 0.95

Grados de libertad = 5

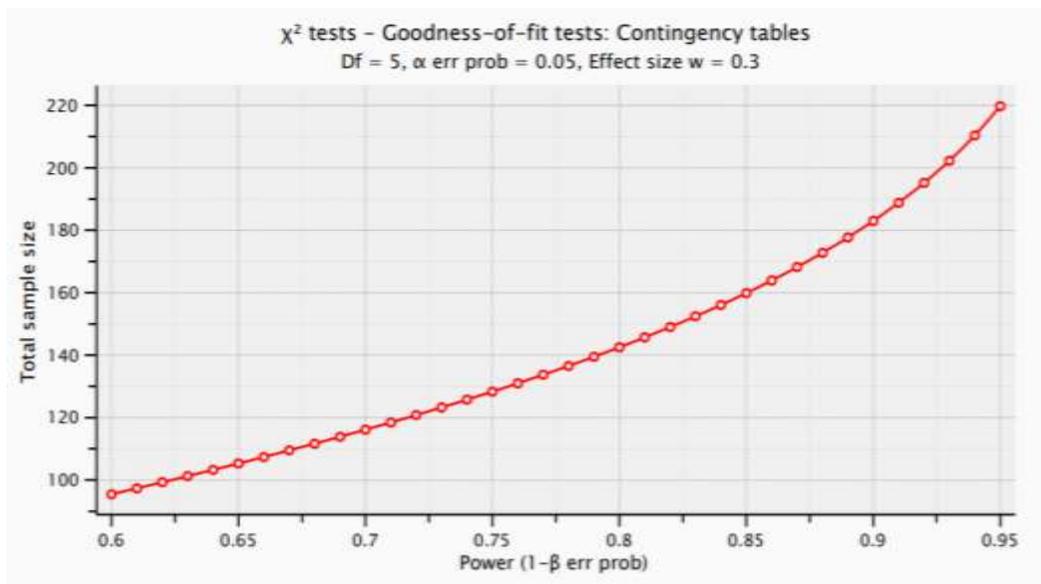
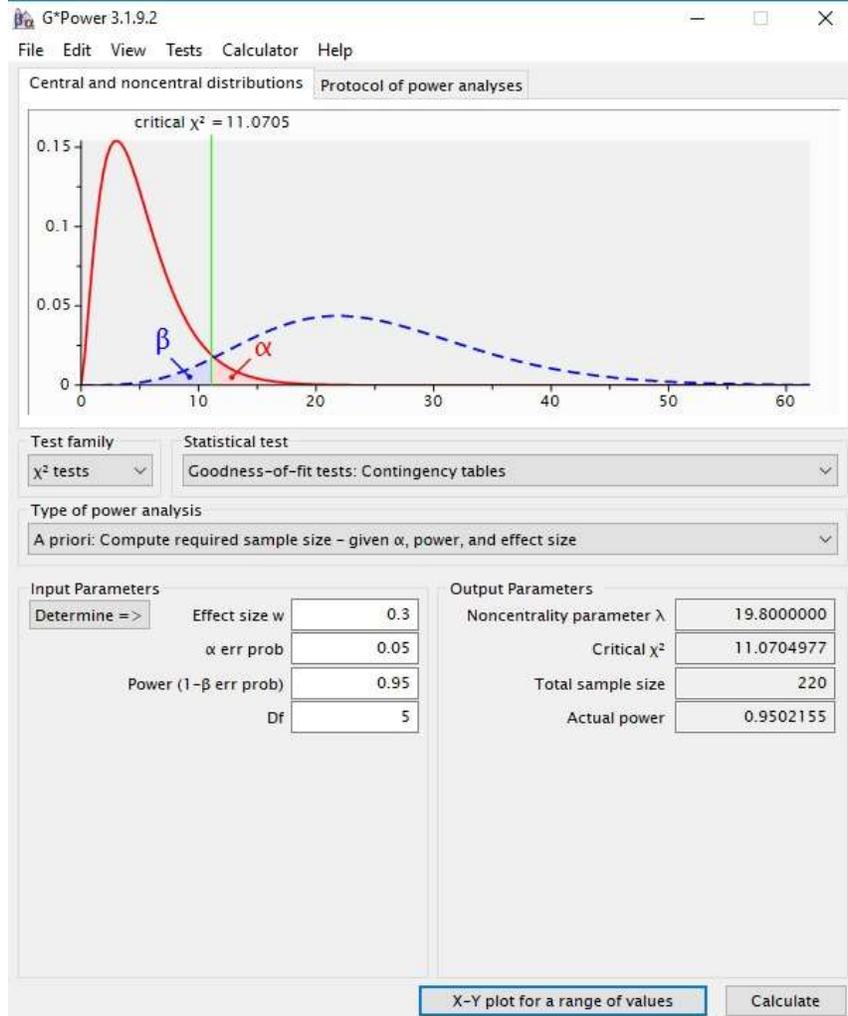
Parámetros de salida:

Parámetro de no centralidad $\lambda = 19.8000000$

X^2 crítica = 11.0704977

Tamaño total de la muestra = 220

Poder actual = 0.9502155



6.4 Criterios de inclusión, exclusión:

Criterios de inclusión:

- Expedientes clínicos de pacientes de ambos sexos y mayores de 18 años edad.
- Expedientes clínicos con diagnóstico de linfoma no Hodgkin difuso de células B grandes y que contaran con reporte de Inmunohistoquímica para MYC ($\geq 40\%$), BCL2 ($\geq 70\%$) y/o BCL6 ($\geq 50\%$).
- Expedientes clínicos que contaran con estudios de laboratorio y gabinete al diagnóstico necesarios para establecer su riesgo mediante la escala de IPI.
- Expedientes clínicos de pacientes que hubieran recibido tratamiento de primera línea.
- Expedientes clínicos que contaran con estudios de imagen (Tomografía axial computarizada o Tomografía por emisión de positrones) para la evaluación de la enfermedad al término del tratamiento.

Criterios de exclusión:

- Expedientes con diagnóstico de linfoma no Hodgkin difuso de células B grandes que no hubieran recibido tratamiento o seguimiento en el Hospital General de México "Dr. Eduardo Liceaga".

6.5 Definición de las variables:

- Variables dependientes (Tabla 2):

Variables dependientes	Definición operacional	Tipo de variable	Escala de medición	Valores
Supervivencia Global	Tiempo transcurrido entre el diagnóstico de la enfermedad y la muerte.	Cuantitativa	Continua	Meses
Supervivencia Libre de Progresión	Tiempo transcurrido entre el diagnóstico de la enfermedad y la presencia de recurrencia, refractariedad o muerte	Cuantitativa	Continua	Meses
Tipo de Respuesta al final del tratamiento	Respuesta obtenida al final de cada línea de tratamiento	Cualitativa	Ordinal	0: Respuesta Completa 1: Respuesta Parcial 2: Enfermedad estable 3: Progresión

- Variables independientes (Tabla 3):

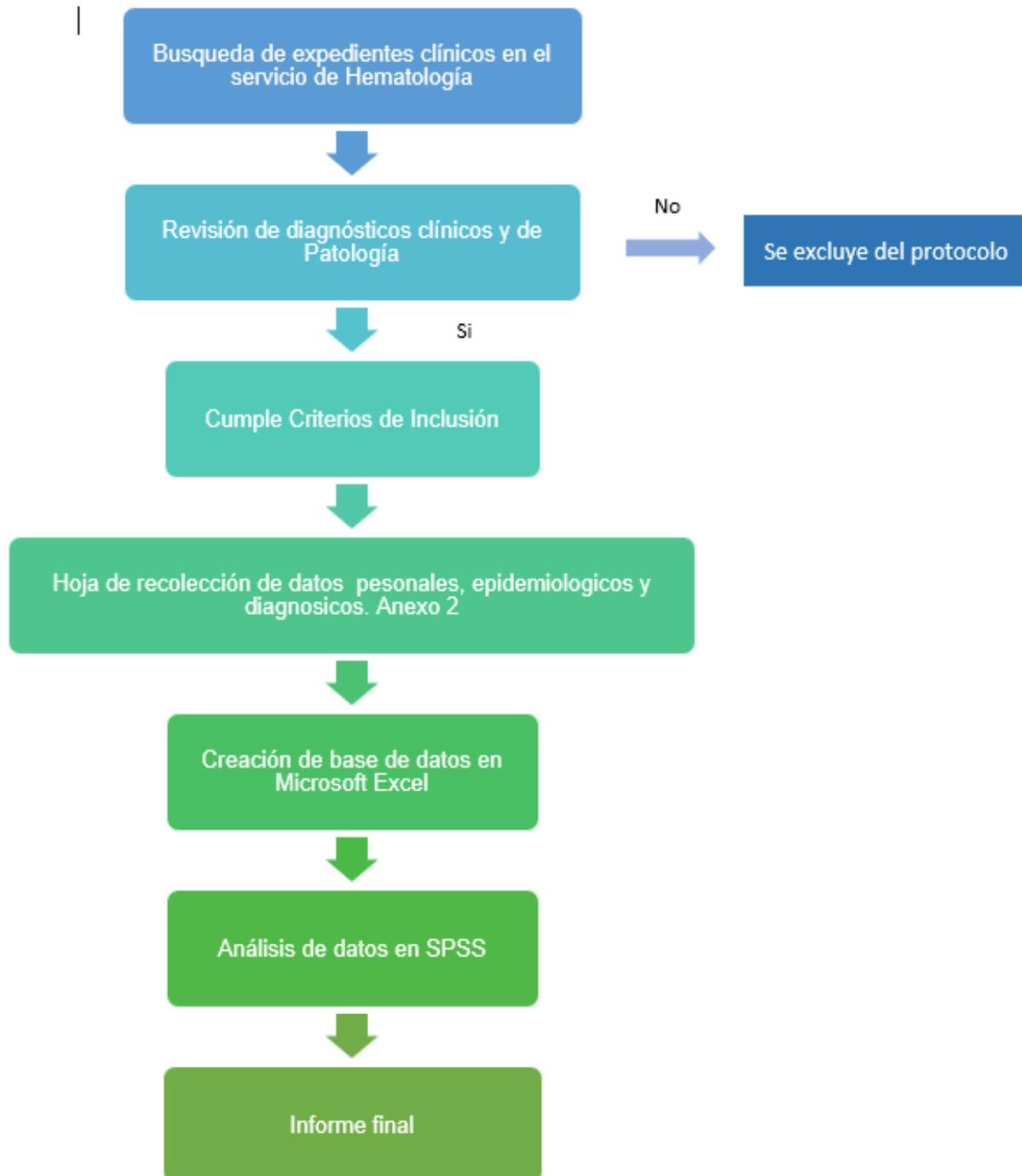
Variables independientes	Definición operacional	Tipo de variable	Escala de medición	Valores
Edad	Tiempo transcurrido desde el nacimiento de un ser vivo	Cuantitativa	Continua	Años
Sexo	Condición orgánica que distingue a los hombres de las mujeres	Cualitativa	Nominal	0: hombre 1: mujer
Niveles séricos de Deshidrogenasa láctica (LDH)	Concentración de LDH al momento del diagnóstico de Linfoma no Hodgkin	Cualitativa	Ordinal	0: LDH sérica >1 pero > 3x valor normal 1: LDH sérica > 3x valor normal
Escala ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group)	Escala que valora la evolución de las capacidades del paciente en su vida diaria manteniendo al máximo su autonomía	Cualitativa	Ordinal	0: ECOG 0,1 1: ECOG 2,3,4.
Estadio clínico	Grado de afección del linfoma basado en la clasificación de Ann Arbor	Cualitativa	Ordinal	0: EC I, II 1: EC III, IV

Invasión extranodal	Invasión del Linfoma en Médula ósea, sistema nervioso central, hígado, tracto gastrointestinal o pulmones.	Cualitativa	Nominal	0: ausente 1: presente
Subtipo de linfoma no Hodgkin difuso de células B grandes	Subclasificación del LDCBG como centro germinal o no centro germinal	Cualitativa	Nominal	0: centro germinal 1: no centro germinal 2: no clasificable
Escala IPI	Escala pronóstica para pacientes con linfoma no Hodgkin difuso de células grandes B	Cualitativa	Ordinal	0: Bajo 1: Intermedio bajo 2: Intermedio alto 3: Alto
Expresión de MYC en los linfocitos B neoplásicos del tejido diagnóstico de LDCBG	Expresión de MYC medida por inmunohistoquímica	Cualitativa	Nominal	0: negativo 1: Positivo ($\geq 40\%$)
Expresión de BCL2 en los linfocitos B neoplásicos del tejido diagnóstico de LDCBG	Expresión de BCL2 medida por inmunohistoquímica	Cualitativa	Nominal	0: negativo 1: Positivo ($\geq 70\%$)
Expresión de BCL6 en los linfocitos B neoplásicos del tejido diagnóstico de LDCBG	Expresión de BCL6 medida por inmunohistoquímica	Cualitativa	Nominal	0: negativo 1: Positivo ($\geq 50\%$)
Tratamiento de primera línea	Esquema de quimioterapia recibido después del diagnóstico	Cualitativa	Nominal	0: R-CHOP 1: Otro 2: Ninguno

6.6 Procedimiento:

Se revisaron los expedientes clínicos de los pacientes con Linfoma no Hodgkin difuso de células B grandes, diagnosticados entre enero de 2014 a diciembre de 2018 en el Hospital General de México "Dr. Eduardo Liceaga", y se extrajeron los porcentajes, determinados por IHC, que indiquen la sobreexpresión de MYC ($\geq 40\%$), BCL2 ($\geq 70\%$) y/o BCL6 ($\geq 50\%$); además se obtuvieron los datos de los estudios de laboratorio y gabinete al diagnóstico necesarios para establecer su riesgo mediante la escala de IPI.

Flujograma:



6.4 Análisis Estadístico:

Para el análisis de los datos obtenidos se utilizó el programa IBM SPSS statistics²². El análisis univariado de la supervivencia global y supervivencias libre de progresión se realizaron por el método de Kaplan-Meier, la comparación entre distintas curvas se realizó mediante el test log-rank; para el análisis multivariado se utilizó el método de Cox. Y para la relación entre variables se utilizó la prueba X^2 con una significancia estadística de $p < 0.05$.

7. RESULTADOS:

Se obtuvo un total de 354 casos de pacientes con LDCGB diagnosticados en el Hospital General de México "Dr. Eduardo Liceaga" entre enero del 2014 y junio del 2018; de los cuales 220 fueron analizables al aplicar los criterios de inclusión, exclusión.

En la Tabla 4. se describen las características clínicas y demográficas de los pacientes con LDCBG incluidos en el estudio. El 56.36% de los pacientes eran hombres; 50.46% de los pacientes eran mayores de 60 años; con una edad media al diagnóstico de 58 años. El 60.91% presentaban una escala ECOG mayor o igual a 2; 67.73% se diagnosticaron en estadios clínicos III ó IV; 63.64% tenían elevación del valor de la DHL sérica; el 62.27% de los pacientes sufrían invasión extranodal; el subtipo histológico más frecuente fue del centro germinal con 56.40%. Al aplicar la escala IPI, el grupo más frecuente fue el de pacientes con un riesgo intermedio alto con un 26.81%. El 30% de los tejidos analizados sobrepresaban MYC, en el 27.3% se encontró sobreexpresión BCL2, y la sobreexpresión de BCL6 fue del 10% en las células neoplásicas.

Tabla 4. Características clínicas y demográficas de los pacientes con LDCBG

Variable	n=220	Porcentaje (%)
Sexo		
Masculino	124	56.36
Femenino	96	43.64
Grupos de edad		
< 60 años	109	49.54
> 60 años	111	50.46
Escala ECOG		
0,1	86	39.09
2,3,4	134	60.91
Estadio clínico (Ann Arbor)		
I, II	71	32.27
III, IV	149	67.73
Nivel sérico de DHL		
Normal	80	36.36
>1 vez </=3 veces lo normal	112	50.92
>3 veces valor normal	28	12.72
Invasión extranodal		
Ausente	83	37.73
Presente	137	62.27
Subtipo histológico		
Centro germinal	124	56.40
No centro germinal	85	38.60
No clasificable	11	5.00
Escala de riesgo IPI		
Bajo	49	22.27
Intermedio bajo	57	25.90
Intermedio alto	59	26.81
Alto	55	25.02
Doble y Triple expresor		
Negativo	154	70.00
Positivo	66	30.00
Sobreexpresión de MYC		
Negativo	154	70.00
Positivo	66	30.00
Sobreexpresión de BLC2		
Negativo	160	72.70
Positivo	60	27.30
Sobreexpresión de BCL6		
Negativo	198	90.00
Positivo	22	10.00
MYC+BCL2	44	20.00
MYC+BCL6	6	2.70
MYC+BCL2+BCL6	16	7.30

El tratamiento y respuesta al tratamiento de los pacientes con LDCBG se describen en la Tabla 5; el 80.5% de los pacientes recibieron tratamiento con esquema RCHOP (Rituximab, ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisona); 68.6% recibieron únicamente una línea de tratamiento. El 70% de los pacientes permanecían vivos al momento de la última consulta, y el 64.5% estaba en respuesta completa .

Tabla 5. Tratamiento y respuesta en pacientes con LDCGB

Tratamiento	n= 220	Porcentaje (%)
Esquema		
RCHOP	117	80.5
Otro	18	8.2
Ninguno	25	11.4
Número de líneas recibidas		
1	151	68.6
2	36	16.4
3 o más	8	3.6
Ninguno	25	11.4
Respuesta después de la primera línea de tratamiento		
Respuesta completa	125	56.8
Respuesta Parcial	18	8.2
Enfermedad estable	2	0.9
Progresión	27	12.3
No valorada	48	21.8
Respuesta al final de todas las líneas		
Respuesta completa	142	64.5
Con actividad neoplásica	12	5.5
Defunción	66	30.0

Supervivencia en los pacientes con LDCBG

Supervivencia global:

En el análisis de supervivencia de los pacientes con Linfoma Difuso de Células B grandes encontramos que la supervivencia global media de la población general de pacientes fue de 32 meses, y la mediana de supervivencia global no fue alcanzada (Figura 2).

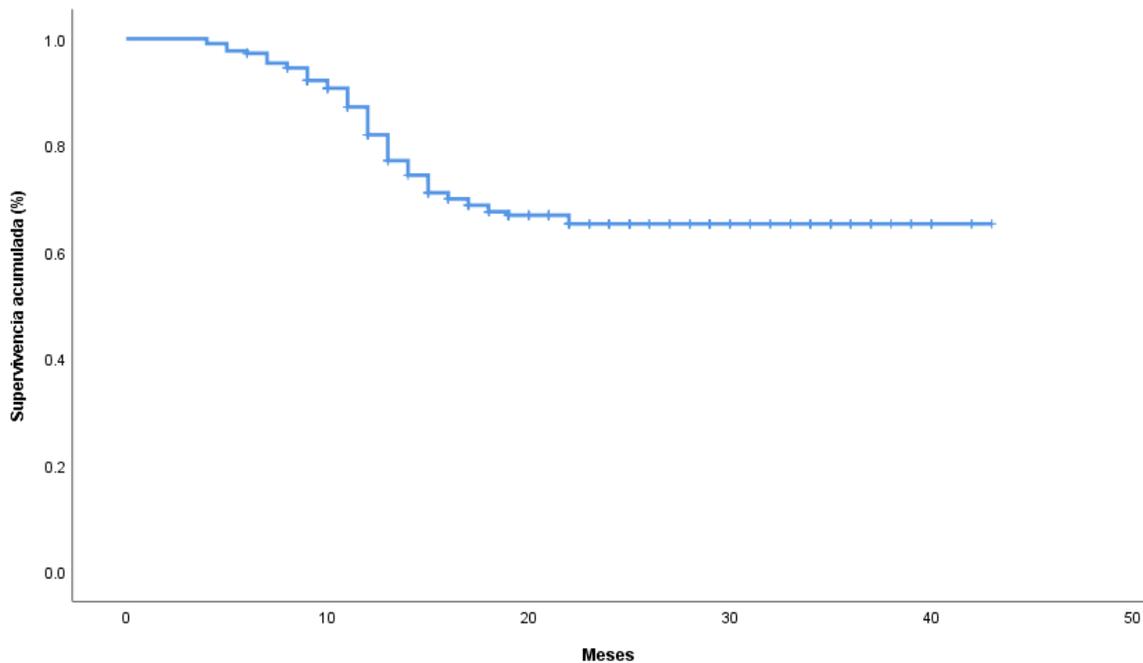


Figura 2. Supervivencia Global para la población general de pacientes con LDCBG

Posterior al análisis univariado se encontró que la supervivencia global disminuyó de manera significativa en aquellos pacientes con Doble y Triple expresión ($p=0.000$) y la presencia de invasión extranodal ($p=0.031$); a diferencia de la edad, ECOG, estadio clínico y el valor de DHL que no se asociaron a menor supervivencia global (Tabla 6 y Figura 5).

Tabla 6. Análisis univariado de supervivencia global dependiente de las variables analizadas

Variable	Supervivencia media (meses, IC 95%)	Valor p
Grupos de edad < 60 años >60 años	33.01 (30.21-35.81) 31.10 (28.08-34.12)	0.179
Escala ECOG 0,1 2,3,4	31.14 (27.71-34.57) 32.47 (29.91-35.04)	0.417
Estadio clínico (Ann Arbor) I, II III, IV	33.39 (30.20-36.58) 31.51 (28.82-34.19)	0.238
Nivel sérico de DHL Normal Elevada	31.33 (28.38-34.28) 31.82 (29.10-34.55)	0.448
Invasión extranodal Ausente Presente	34.52 (31.57-37.47) 30.31 (27.48-33.14)	0.031
IPI: Bajo Intermedio bajo Intermedio alto Alto	34.8 (31.1-38.6) 28.9 (25.1-32.8) 32.1 (28-32.6) 30.6 (26.3-34.8)	0.55
Doble y Triple expresor Negativo Positivo	35.35 (33.19-37.51) 24.66 (20.89-28.43)	0.000

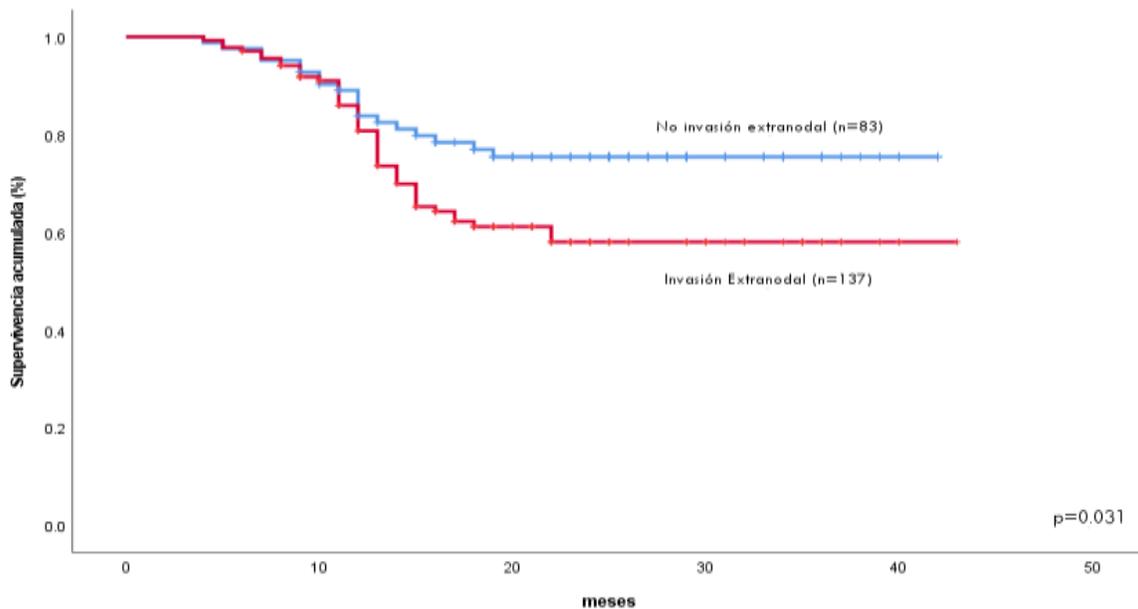


Figura 5. Supervivencia global dependiente de la invasión extranodal

La media de supervivencia global fue de 35.35 meses (IC 95% 33.19-37.51) para el grupo no expresor y de 24.66 meses para los Doble y Triple expresores (IC 95% 20.89-28.43) con valor de $p=0.000$; la mediana de supervivencia global no se alcanzó para el grupo de pacientes no expresores, y para el grupo Doble y Triple expresor la mediana de supervivencia global fue de 15 meses (IC 95% 11.64-18.35) (Figura 3).

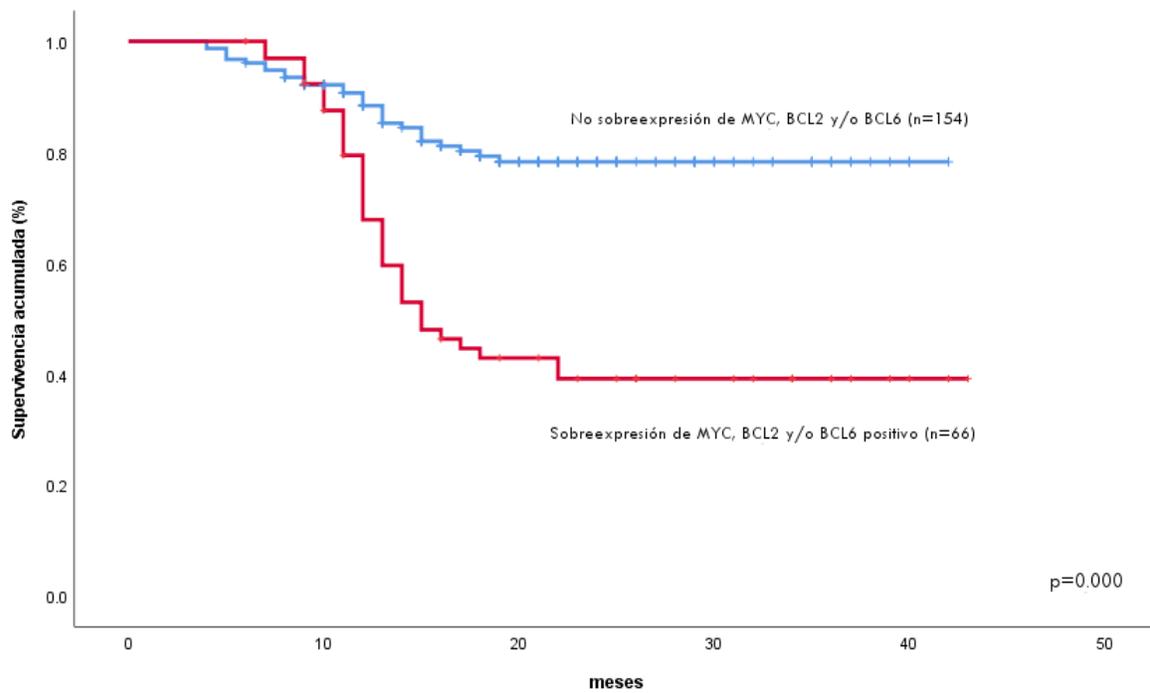


Figura 3. Supervivencia global dependiente de la sobreexpresión de MYC, BCL2 y/o BCL6

Supervivencia libre de progresión:

La supervivencia libre de progresión si disminuyó de manera significativa en aquellos pacientes Doble y Triple expresores con una media de 7.83 meses (IC 95% 2.51-13.16) con valor de $p=0.000$; y la mediana de supervivencia libre de progresión fue de 3 meses (IC 95% 0.136-5.864) (Figura 3).

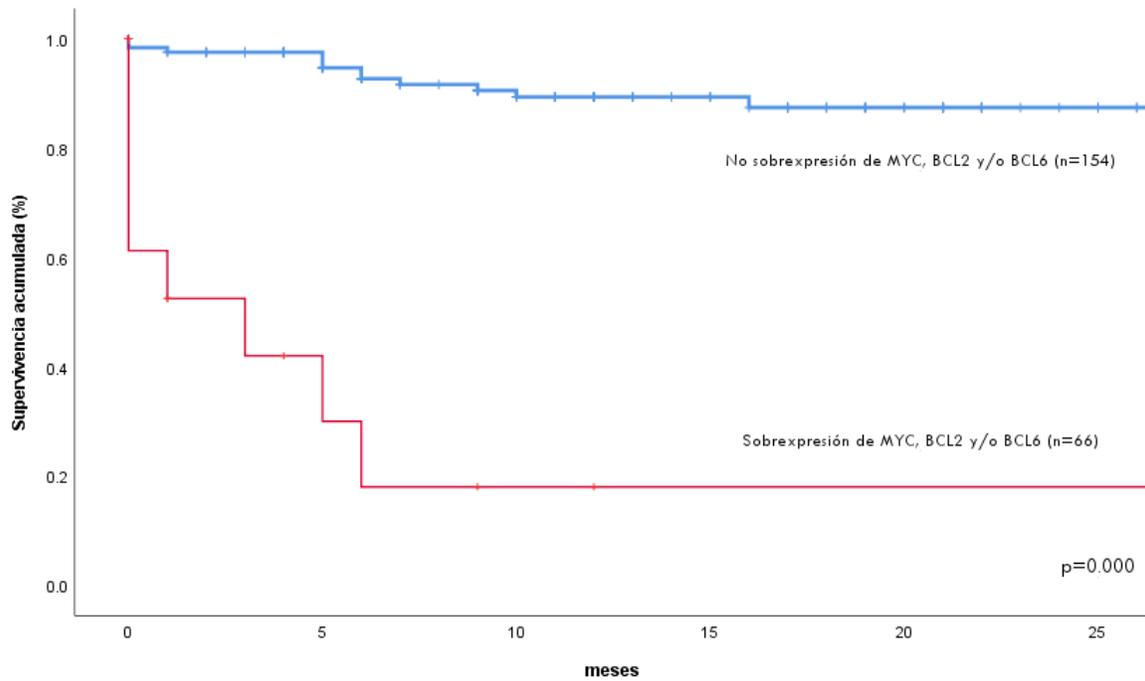


Figura 4. Supervivencia libre de progresión dependiente de la sobreexpresión de MYC, BCL2 y/o BCL6

La supervivencia libre de progresión disminuyó de manera significativa en aquellos pacientes con Doble y Triple expresión ($p=0.000$), a diferencia de la edad, ECOG, estadio clínico, el valor de DHL y la invasión extranodal no se asociaron a menor supervivencia libre de progresión (Tabla 7).

Tabla 7. Análisis univariado de supervivencia libre de progresión dependiente de las variables analizadas

Variable	Supervivencia media (meses, IC 95%)	Valor p
Grupos de edad < 60 años >60 años	22.55 (19.61-25.48) 24.62 (21.19-28.05)	0.694
Escala ECOG 0,1 2,3,4	24.61 (20.70-28.53) 22.95 (20.40-25.51)	0.910
Estadio clínico (Ann Arbor) I, II III, IV	22.64 (19.05-26.23) 24.84 (21.72-27.96)	0.584
Nivel sérico de DHL Normal Elevada	22.39 (18.94-25.84) 24.46 (21.35-27.57)	0.575
Invasión extranodal Ausente Presente	25.85 (22.94-28.76) 22.81 (19.55-26.06)	0.089
Doble y Triple expresor Negativo Positivo	27.40 (25.62-29.19) 7.83 (21.86-26.82)	0.000
IPI Bajo Int Bajo Int Alto Alto	26.45(21.80-31.10) 24 (20.21-27.80) 24.16(20.57-27.78) 19.35(14.93-23-77)	0.160

Correlación de la sobreexpresión de MYC, BCL2 y/o BCL6 con otras variables clínicas:

Se realizó un análisis de la correlación de la sobreexpresión de MYC, BCL2 y/o BCL6 con variables clínicas donde no se encontró asociación significativa entre la doble y triple expresión de células neoplásicas con las demás variables como la edad, sexo, ECOG, estadio clínico, niveles de DHL, subtipo histológico, escala pronóstica de IPI (Tablas 8).

Tabla 8. Correlación entre la Sobreexpresión de MYC, BCL2 y/o BCL6 con el resto de las variables

Variable	Doble y Triple Expresores (%)	Negativo (%)	Valor p
Grupos de edad < 60 años > 60 años	28 (42.42) 38 (57.57)	82 (53.24) 72 (46.75)	0.141
Sexo Masculino Femenino	34 (51.51) 32 (48.48)	90 (58.44) 64 (41.55)	0.342
Escala ECOG 0,1 2,3,4	26 (39.39) 40 (60.60)	60 (38.96) 94 (61.03)	0.952
Estadio clínico (Ann Arbor) I, II III, IV	23 (34.84) 43 (65.15)	48 (31.16) 106 (68.83)	0.593
Nivel sérico de DHL Normal Elevada	32 (48.48) 34 (51.51)	48 (31.16) 106 (68.83)	0.014
Invasión extranodal Ausente Presente	25 (37.87) 41 (62.12)	58 (37.66) 96 (62.33)	0.796
Subtipo histológico Centro germinal No Centro germinal No clasificable	34 (51.51) 27 (40.90) 5 (7.57)	90 (58.44) 58 (37.66) 6 (3.89)	0.413
Escala de riesgo IPI Bajo Intermedio bajo Intermedio alto Alto	24 (36.36) 12 (18.18) 11 (16.66) 19 (28.78)	25 (16.23) 45 (29.22) 48 (31.16) 36 (23.37)	0.002

El análisis multivariante se identificó que el único factor independiente que afectó negativamente al sistema operativo fue la sobreexpresión de MYC, BCL2 y/o BCL6 (Tabla 9.)

Tabla 9. Análisis multivariado de supervivencia global dependiente de las variables analizadas

Variable	Hazard ratio (95% IC)	Valor p
Edad >60 años	1.27 (0.77-2.09)	0.344
Escala ECOG >= 2	0.77 (0.47-1.27)	0.311
Estadio clínico (Ann Arbor) III, IV	1.29 (0.75-2.2)	0.343
DHL elevada	1.48 (0.88-2.49)	0.138
Invasión extranodal	1.70 (0.99-2.91)	0.053
Índice pronóstico internacional (IPI)	1.19 (0.96-1.46)	0.096
No Centro germinal	1.35 (0.91-2.01)	0.140
Doble o Triple Expresor	3.73 (2.26-6.18)	0.000

Frecuencia y relación de la sobreexpresión de MYC, BCL2 y/o BCL6 con la supervivencia global:

Al analizar la frecuencia y su relación con la supervivencia global de los pacientes con sobreexpresión de MYC BCL-2 y BCL6, se observó que el 43.9% fueron positivos para la sobreexpresión de MYC, el 45.0% fueron positivos para sobreexpresión de BCL-2 y el 59.1% para la sobreexpresión de BCL-6.

La media de supervivencia global fue de 24.66 meses (IC 95% 20.89-28.43), con valor de p=0.000, para el grupo que sobreexpresaba MYC. Los pacientes que tenían sobreexpresión de BCL-2 tuvieron una media de supervivencia global de 25.16 meses (IC 95% 21.20-29.12) p=0.000; y los pacientes con sobreexpresión de BCL-6 la supervivencia global fue de 28.73 meses (IC 95% 21.94-35.53) (Figura 6, 7 y 8).

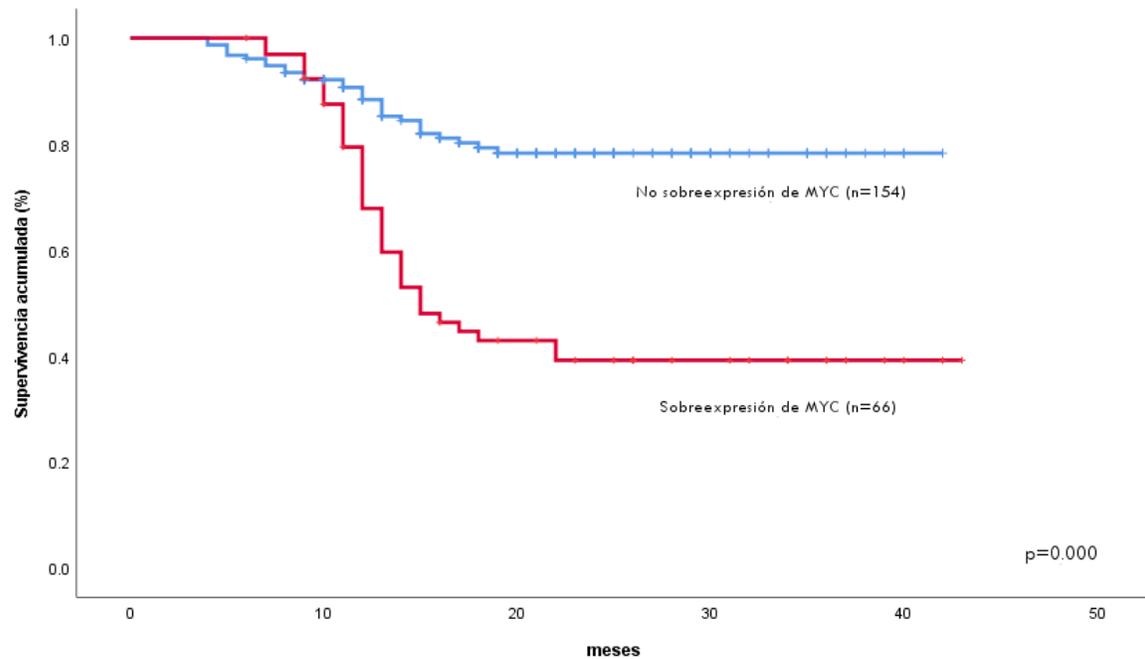


Figura 6. Supervivencia dependiente de la sobreexpresión de MYC

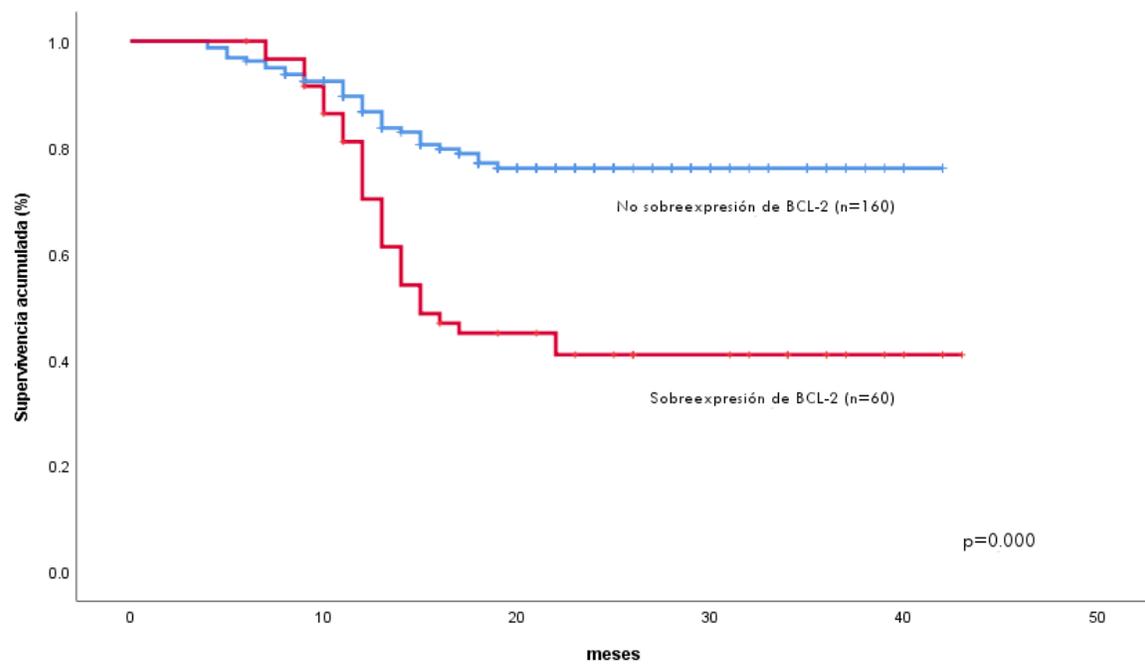


Figura 7. Supervivencia dependiente de la sobreexpresión de BCL-2

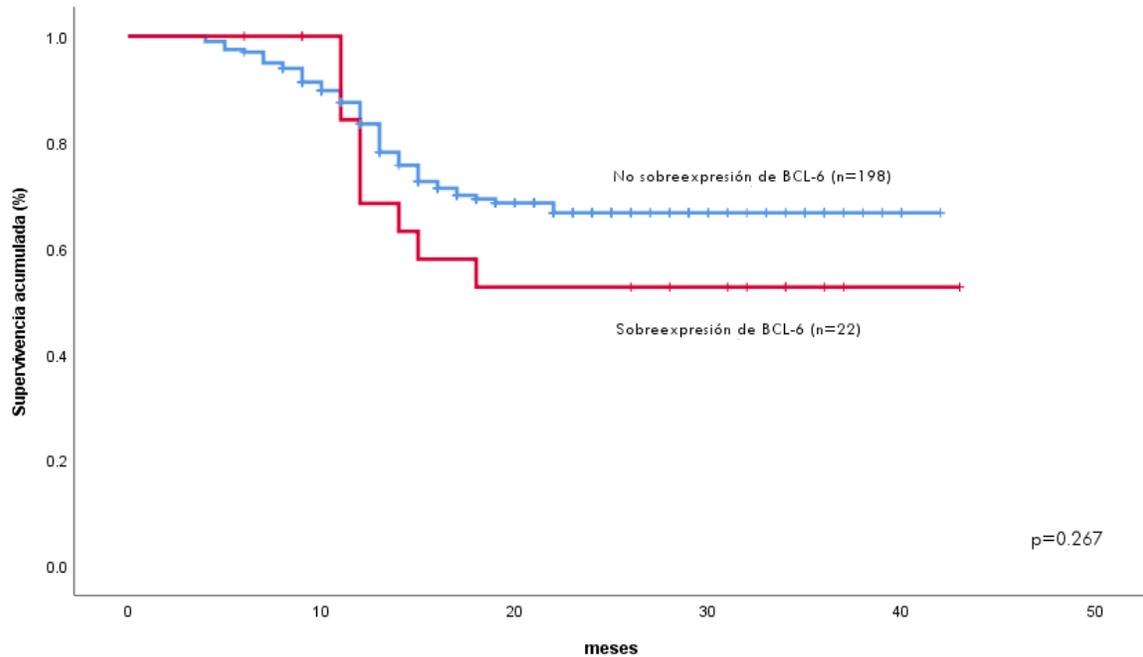


Figura 8. Supervivencia dependiente de la sobreexpresión de BCL-6

8. ANÁLISIS DE RESULTADOS

LDCBG, no especificado constituye el 25-30% de los linfomas no Hodgkin adultos en países occidentales y un mayor porcentaje (37%) en China. El mal pronóstico de los pacientes con LDCBG cuyos tumores sobreexpresan MYC o BCL2, o BCL6 está bien establecido. Además, se ha demostrado que el impacto pronóstico negativo de la sobreexpresión de MYC, BCL2 y/o BCL6 se ha confirmado en pacientes con LDCBG de poblaciones occidentales tratadas con R-CHOP. También se ha demostrado que las puntuaciones inmunohistoquímicas combinadas de MYC, BCL2 y BCL6 predicen SG a 5 años y SLP a 5 años en pacientes con DLBCL independientemente del IPI después del tratamiento con R-CHOP. En contraste, Johnson et al. quienes informaron que la sobreexpresión de MYC predijo una SG

deficiente a 3 años y una SLP en pacientes tratados con R-CHOP, pero no en pacientes tratados con CHOP con mecanismo desconocido. Estos hallazgos contradictorios pueden deberse a la heterogeneidad de la población, los diferentes puntos finales del tiempo hasta el evento y los diferentes tratamientos de segunda y/o tercera línea; y por lo tanto se necesitan diferentes poblaciones tratadas uniformemente dentro de un ensayo prospectivo multicéntrico para consolidar aún más el valor pronóstico de MYC combinado con la sobreexpresión de proteínas BCL2 y BCL6.

En nuestro estudio, la incidencia de LDCBG por sexo tuvo una relación mujer:hombre de aproximadamente 1.4:1, mientras que, a nivel mundial, GLOBOCAN 2012 reporta una relación mujer:hombre de 0.77:1. La edad media al diagnóstico fue de 58.9 años, el 60.91% de nuestros pacientes presentaban un estado funcional deteriorado medido por la escala ECOG, el 67.7% se diagnosticaron en estadios clínicos avanzados, 63.64% de los pacientes tenían DHL elevada y un 62.27% padecían enfermedad extranodal. Todos estos hallazgos fueron similares a los reportados por los grupos que desarrollaron las escalas IPI.

Al realizar el análisis de supervivencia por separado para las variables como la edad, ECOG, estadio clínico, niveles de DHL al diagnóstico e infiltración extranodal, únicamente la presencia de invasión extranodal se asoció significativamente a menor supervivencia, contrastando con lo reportado por los grupos desarrolladores de las escalas IPI quienes encontraron una relación significativa entre menor supervivencia y mayor edad, estadio clínico avanzado (III, IV) e invasión extranodal, esto puede deberse al poco tiempo de seguimiento registrado o al menor número de pacientes que los analizaron por dichos grupos. Al aplicar la escala de IPI y asignar un riesgo a cada paciente (bajo, intermedio bajo, intermedio alto, alto) en función del puntaje obtenido, la supervivencia no disminuyó significativamente a medida que aumento el riesgo y las curvas de supervivencia mostraron un comportamiento diferente al descrito por los autores de la escala IPI, con una supervivencia media de 34.89 meses para el grupo de bajo riesgo, comparada con 30.61 meses para el de alto riesgo.

Varios estudios han intentado utilizar los patrones de expresión inmunohistoquímica como indicadores pronósticos en pacientes con LDCBG. Hans y col. informaron que una combinación de CD10, BCL6 y expresión de MUM1 podría subdividir a los pacientes con LDCBG en sobrevivientes a corto y largo plazo. Sin embargo, se han informado resultados contradictorios sobre el papel pronóstico de la clasificación de Hans.

En nuestro estudio, la supervivencia no disminuyó significativamente en función del subtipo histológico (centro germinal, no centro germinal, no clasificable), esto puede obedecer al hecho de que la determinación del origen de la célula neoplásica se realizó mediante inmunohistoquímica, mientras que los datos aportados por Rosenwald y cols. que demostraban una menor supervivencia en los pacientes con el subtipo no centro germinal, fueron obtenidos utilizando técnicas moleculares (microarreglos de ADN).

Además, es importante mencionar que se ha demostrado que la inmunotinción para MYC, BCL2 y BCL6, predice la presencia de roturas de MYC, fusión de IGH/BCL2 y roturas de BCL6 detectadas por FISH en los LDCBF con alta especificidad (> 90%). Por lo tanto, todos los pacientes con expresión de proteínas deben ser probados por FISH para la translocación génica correspondiente. Diferentes metodologías de tinción y puntuación, valores de corte y poblaciones pueden causar esta discrepancia.

Aunque las translocaciones MYC, BCL2 y BCL6 pueden ser detectadas por FISH, FISH no puede detectar la desregulación génica causada por mecanismos distintos a la translocación.

El porcentaje de los casos que fueron positivos en nuestro estudio, para la sobreexpresión de MYC, BCL2 y/o BCL6 fue del 30%, lo cual concuerda con lo descrito en la literatura reportada, sin embargo, los pacientes que sobreexpresaba MYC, BCL2 y/o BCL6 en células neoplásicas, es decir los Doble y/o Triple

expresores, no se asoció significativamente a mayor edad, estado funcional deteriorado (ECOG 2,3,4), estadio clínico avanzado (III, IV), DHL aumentada, o a un subtipo histológico específico; pero la invasión extranodal si demostró tener una menor supervivencia. Cuando analizamos la sobreexpresión de MYC, BCL2 y/o BCL6 se observó que este grupo de pacientes tenían una menor supervivencia global con una media de 24 meses, estadísticamente significativa ($p=0.000$); lo mismo se observó cuando analizamos las gráficas de supervivencia libre de progresión, evidenciando que los pacientes que tenían la sobreexpresión en células neoplásicas tuvieron una media de 7.8 meses, estadísticamente menor ($p=0.000$).

Ya que nuestro estudio revela un porcentaje importante de casos con sobreexpresión de MYC, BCL2 y/o BCL6, el siguiente paso será discriminar por técnicas moleculares (PCR) de las proteínas expresadas por las células neoplásicas del Linfoma difuso de células B grandes idealmente al diagnóstico de los pacientes y evaluar si estos pacientes se benefician de otros esquemas de tratamiento en primera línea para mejorar la supervivencia libre de progresión en este grupo de pacientes.

9. CONCLUSIONES

Con base a los resultados podemos concluir que existen casos de pacientes con diagnóstico de Linfoma no Hodgkin Difuso de Células Grandes B que sobreexpresan MYC, BCL2 y BCL6 en los linfocitos B neoplásicos.

Sin embargo, por medio de este estudio no podemos determinar la isoforma, o modificaciones postraduccionales de las proteínas MYC, BCL2 y BCL6 que estaban sobreexpresadas en los pacientes con linfoma difuso de células B grandes; a pesar de que, en el momento del análisis, se encontró una relación significativa entre la sobreexpresión de MYC, BCL2 y/o BCL6 y disminución en la supervivencia global y supervivencia libre de progresión en pacientes con linfoma difuso de células B grandes.

Ahora que conocemos el pronóstico de los pacientes con LDCBG que presentan la sobreexpresión de MYC, BCL2 y/o BCL6 en el servicio de Hematología del Hospital General de México, es necesario realizar otros estudios que evalúen la refractariedad al tratamiento estándar de primera línea en estos pacientes y valorar cambiar a tratamientos con esquemas más intensivos, todo esto con el objetivo de mejorar el pronóstico de los pacientes con LDCBG.

10. REFERENCIAS

1. Krol AD, le Cessie S, Snijder S, Kluin-Nelemans JC, Kluin PM, et al. Primary extranodal non-Hodgkin's lymphoma (NHL): the impact of alternative definitions tested in the Comprehensive Cancer Centre West population-based NHL registry. *Ann Oncol* 2003; 14: 131–139.
2. Li XQ, Li GD, Gao ZF, Zhou XG, Zhu XZ. The relative frequencies of lymphoma subtypes in China: a nationwide study of 10002 cases by the Chinese Lymphoma Study Group. *Ann Oncol* 2011; 22: iv141.
3. Ziepert M, Hasenclever D, Kuhnt E, Glass B, Schmitz N, et al. Standard International prognostic index remains a valid predictor of outcome for patients with aggressive CD20+ B-cell lymphoma in the rituximab era. *J Clin Oncol* 2010; 28: 2373–2380.
4. Pfreundschuh M. Growing importance of MYC/BCL2 immunohistochemistry in diffuse large B-cell lymphomas. *J Clin Oncol* 2012; 30: 3433–3435.
5. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 2000; 403: 503–511.
6. Rosenwald A, Wright G, Chan WC, Connors JM, Campo E, et al. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 2002; 346: 1937–1947.
7. Hussain AR, Uddin S, Ahmed M, Al-Dayel F, Bavi PP, et al. Phosphorylated I κ B α predicts poor prognosis in activated B-cell lymphoma and its inhibition with thymoquinone induces apoptosis via ROS release. *PLoS One* 2013; 8: e60540.
8. Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, Gascoyne RD, Delabie J, et al. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood* 2004; 103: 275–282.
9. Gutierrez-Garcia G, Cardesa-Salzman T, Climent F, Gonzalez-Barca E, Mercadal S, et al. Gene-expression profiling and not immunophenotypic algorithms predicts prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with immunochemotherapy. *Blood* 2011; 117: 4836–4843.
10. Toda H, Sato Y, Takata K, Orita Y, Asano N, et al. Clinicopathologic analysis of localized nasal/paranasal diffuse large B-cell lymphoma. *PLoS One* 2013; 8: e57677.
11. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues: Lyon, France, IARC Press 2008.
12. Swerdlow, S. H. *et al.* The 2016 revision of the World Health Organization (WHO) classification of lymphoid neoplasms. *Blood* 127, (2375 (2016)).
13. Lu Li. Prognostic significances of overexpression MYC and/or BCL2 in R-CHOP-treated diffuse large B-cell lymphoma: A Systematic review and meta-analysis. *Scientific Reports*. (2018) 8:6267. DOI:10.1038/s41598-018-24631-5

14. Shiozawa E, Yamochi-Onizuka T, Takimoto M, Ota H. The GCB subtype of diffuse large B-cell lymphoma is less frequent in Asian countries. *Leuk Res* 2007; 31: 1579–1583.
15. Klapper W, Stoecklein H, Zeynalova S, Ott G, Kosari F, et al. 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* 2008; 22: 2226–2229.
16. Chen PM, Yang MH, Yu IT, Lin JT, Lin YC, et al. Low incidence of BCL6 gene alterations for diffuse large B-cell lymphomas in Taiwan Chinese. *Cancer* 2002; 94: 2635–2644.
17. Heike Horn, Marita Ziepert, Claudia Becher, Thomas F. E. Barth, Heinz-Wolfram Bernd. MYC status in concert with BCL2 and BCL6 expression predicts outcome in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* (2013) 121 (12): 2253–2263.
18. Horn H, Ziepert M, Becher C, Barth TF, Bernd HW, et al. MYC status in concert with BCL2 and BCL6 expression predicts outcome in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2013; 121: 2253–2263.
19. Otto G, Ziepert M, Klapper W, et al. Immunoblastic morphology but not the immunohistochemical GCB/nonGCB classifier predicts outcome in diffuse large B-cell lymphoma in the RICOVER-60 trial of the DSHNHL. *Blood*. 2010; 116(23): 4916-4925.
20. Lin P, Medeiros LJ. High-grade B-cell lymphoma/leukemia associated with t(14;18) and 8q24/MYC rearrangement: a neoplasm of germinal center immunophenotype with poor prognosis. *Haematologica* 2007; **92**: 1297–301.
21. Coiffier B, Thieblemont C, van den Neste E, et al. Long-term outcome of patients in the LNH-98.5 trial, the first randomized study comparing rituximab CHOP to standard CHOP chemotherapy in DLBCL patients: a study by the Groupe d'Etudes des Lymphomes de l'Adulte. *Blood* 2010; **116**: 2040–45.
22. Johnson NA, Slack GW, Savage KJ, et al. Concurrent expression of MYC and BCL2 in diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone. *J Clin Oncol* 2012; **30**: 3452–59.
23. Wilson WH, O'Connor OA, Czuczman MS, et al. Navitoclax, a targeted high affinity inhibitor of BCL-2, in lymphoid malignancies: a phase 1 dose-escalation study of safety, pharmacokinetics, pharmacodynamics, and antitumour activity. *Lancet Oncol* 2010; **11**: 1149–59.
24. Bellas C, Garcia D, Vicente Y, et al. Immunohistochemical and molecular characteristics with prognostic significance in diffuse large B-cell lymphoma. *PLoS One* 2014; **9**: e98169.
25. Boxer LM, Dang CV. Translocations involving c-myc and c-myc function. *Oncogene* 2001; **20**: 5595–610.
26. Oki Y, Noorani M, Lin P, et al. Double hit lymphoma: the MD Anderson Cancer Center clinical experience. *Br J Haematol* 2014; **166**: 891–901.

27. Hu S, Xu-Monette ZY, Tzankov A, et al. MYC/BCL2 protein coexpression contributes to the inferior survival of activated B-cell subtype of diffuse large B-cell lymphoma and demonstrates high-risk gene expression signatures: a report from The International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program. *Blood* 2013; **121**: 4021–31.
28. Souers AJ, Levenson JD, Boghaert ER, et al. ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. *Nat Med* 2013; **19**: 202–08.
29. Kelly GL, Grabow S, Glaser SP, et al. Targeting of MCL-1 kills MYC-driven mouse and human lymphomas even when they bear mutations in p53. *Genes Dev* 2014; **28**: 58–70.
30. Spender LC, Inman GJ. Developments in Burkitt's lymphoma: novel cooperations in oncogenic MYC signaling. *Cancer Manag Res* 2014; **6**: 27–38.
31. Oki Y, Noorani M, Lin P, et al. Double hit lymphoma: the MD Anderson Cancer Center clinical experience. *Br J Haematol* 2014; **166**: 891–901.
32. Zhou K, Xu D, Cao Y, Wang J, Yang Y, Huang M. C-MYC aberrations as prognostic factors in diffuse large B-cell lymphoma: a metaanalysis of epidemiological studies. *PLoS One* 2014; **9**: e95020.
33. Vaidya R, Witzig TE. Prognostic factors for diffuse large B-cell lymphoma in the R(X)CHOP era. *Ann Oncol* 2014; **25**: 2124–33.
34. Parry D, Guzi T, Shanahan F, et al. Dinaciclib (SCH 727965), a novel and potent cyclin-dependent kinase inhibitor. *Mol Cancer Ther* 2010; **9**: 2344–53.
35. Cinar M, Rosenfelt F, Rokhsar S, et al. Concurrent inhibition of MYC and BCL2 is a potentially effective treatment strategy for double hit and triple hit B-cell lymphomas. *Leuk Res* 2015; **39**: 730–38.
36. Gregory GP, Hogg SJ, Kats LM, et al. CDK9 inhibition by dinaciclib potently suppresses Mcl-1 to induce durable apoptotic responses in aggressive MYC driven B-cell lymphoma in vivo. *Leukemia* 2014; **29**: 1437–41.
37. Cerchetti LC, Ghetu AF, Zhu X, et al. A small-molecule inhibitor of BCL6 kills DLBCL cells in vitro and in vivo. *Cancer Cell* 2010; **17**: 400–11.
38. Leskov I, Pallasch CP, Drake A, et al. Rapid generation of human B-cell lymphomas via combined expression of Myc and Bcl2 and their use as a preclinical model for biological therapies. *Oncogene* 2013; **32**: 1066–72.
39. Adam M, Petrich, Mitul Gandhi, Borko Jovanovic, Impact of induction regimen and stem cell transplantation on outcomes in double-hit lymphoma: a multicenter retrospective analysis. *Blood* (2014) 124 (15): 2354–2361.

11. ANEXOS

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

“IMPACTO PRONÓSTICO DE LA SOBREEXPRESIÓN DE MYC, BCL2 Y/O BCL6 EN PACIENTES CON LINFOMA NO HODGKIN DIFUSO DE CÉLULAS B GRANDES” HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO “DR. EDUARDO LICEAGA”

No. Expediente clínico único: _____ No. Boleta: _____

No. Biopsia: _____ Biopsia de tejido parafinado: _____

Edad: _____ Fecha de Nacimiento: _____ Sexo: F M

Fecha de Diagnóstico: _____

- Subtipo de Linfoma no Hodgkin difuso de células B grandes:
Centro Germinal: No Centro Germinal: No Clasificable:
- Niveles séricos de Deshidrogenasa láctica (DHL):
LDH sérica >1 pero <3x valor normal: LDH sérica >3x valor normal:
- Escala ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group):
0 – 1: mayor a 2:
- Estadio Clínico (Clasificación de Ann Arbor):
EC: I – II EC: III – IV
- Invasión Extranodal:
Ausente: Presente:
- Escala de IPI:
Bajo: Intermedio bajo: Intermedio alto: Alto:
- Expresión de MYC en tejido diagnóstico de LDCBG:
Positivo: Negativo:
- Expresión de BCL2 en tejido diagnóstico de LDCBG:
Positivo: Negativo:
- Expresión de BCL6 en tejido diagnóstico de LDCBG:
Positivo: Negativo:
- Tipo de Respuesta al tratamiento de primera línea:
Respuesta completa: Respuesta parcial:
Enfermedad estable: Progresión: