



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGIA

CURSO DE ESPECIALIDAD EN HEMATOLOGIA

EVALUAR EL IMPACTO PRONOSTICO DE LAS MUTACIONES DEL
CODON 641 EN EL EXON 16 DE EZH2 EN ADN CIRCULANTE DE
PACIENTES CON LINFOMA DIFUSO DE CÉLULAS GRANDES B Y
COMPARAR EL RESULTADO CON EL ANÁLISIS DEL ADN TUMORAL
TRATADOS CON EL ESQUEMA CHOP-RITUXIMAB EN EL INSTITUTO
NACIONAL DE CANCEROLOGÍA: UN ESTUDIO DE COHORTE

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
SUBESPECIALISTA EN HEMATOLOGIA

PRESENTA:

DRA. SINDY ANIELKA GUTIERREZ CHAVARRIA.

DRA. MYRNA GLORIA CANDELARIA HERNANDEZ.
DIRECTOR DE TESIS

MEXICO, CIUDAD DE MEXICO 12 DE OCTUBRE 2021.





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A Dios y mi Virgencita de Guadalupe:

Sin su aliento y misericordia no habría podido estar aquí.

Al amor de mi vida:

Porque desde el primer momento, depositaste tu confianza en mí.... Por tu apoyo incondicional en todos los momentos vividos en esta hermosa montaña rusa, gracias porque siempre me alentaste y sobre todo porque me hiciste mantener la calma.

A mis padres:

Por enseñarme no solo principios y valores, sino que el límite es el cielo.
A mi papá que siempre me ha enseñado con su ejemplo, que ser pobre no es excusa para no cumplir un sueño, que aunque los días se tornen oscuros, siempre hay un mañana donde sale el sol.

A mis hermanas:

Por sus buenos deseos y consejos.
Karinna Gutiérrez Chavarría siempre has creído en mí, siempre me alentaste en todo momento, sos más que mi hermanita menor.

A mi tutora:

Por su apoyo incondicional durante los tres años de la especialidad, porque siempre hubo palabras de aliento y confianza hacia mí.

A mis maestros y amigos:

Con esto me refiero a las personas que estuvieron ahí en el momento exacto de mi especialidad, compartieron conmigo sus conocimientos y experiencias en especial a la Dra. Nidia Zapata Canto y al Dr. Ramiro Espinoza.

A los pacientes:

Son el motor por el cual nos dedicamos a este universo, para luchar juntos esta ardua batalla.

INDICE

Agradecimientos	2
Índice	3
Resumen	4
Marco Teórico	5-24
Planteamiento del problema	26
Justificación	27
Objetivos	28
Hipótesis	29
Material y Métodos	30-38
Consideraciones éticas	39
Resultados	40-47
Análisis y Discusión de resultados	48-50
Conclusiones	51
Bibliografía	52-59
Anexos	60-66

RESUMEN

El linfoma difuso de células grandes B (LDCGB), es un linfoma agresivo que requiere de la comprensión de su biología tumoral, resultado de alteraciones genéticas y epigenéticas, para individualizar las opciones de tratamiento. La mayoría de pacientes alcanza respuesta con la primera línea de tratamiento, sin embargo la recaída está latente. El objetivo principal del estudio era evaluar el impacto pronóstico de las mutaciones en el codón 641 en el exón 16 de EZH2 en el ADN circulante y en ADN tumoral en pacientes con diagnóstico de Linfoma difuso de células grandes B tratados con el esquema CHOP- Rituximab en el Instituto Nacional de Cancerología. Se incluyeron 138 pacientes, de una cohorte de pacientes con LDCBG tratados entre 2016 y 2020, que cumplían con criterios de inclusión. Todos firmaron el consentimiento informado. La extracción del ADN se hizo a partir de sangre periférica y de los bloques de parafina que se encontraban en servicio de patología de las biopsias obtenidas a su ingreso a la unidad hospitalaria. Posteriormente se realizó la amplificación con cadena de polimerasa y secuenciación tipo Sanger. Se consideró a la presencia o no de la mutación en el tumor, como el estándar de referencia. Resultados: Predominó el sexo masculino 50,7%, ECOG ≥ 2 49,3%, Estadio III-IV 69,6%, IPI de alto riesgo 43,5% de la población de estudio, 116 pacientes son verdaderos falsos negativos, 10 verdaderos positivos, 11 falsos negativos y curiosamente un caso con una mutación circulante sin detección en el tumor la concentración media de ct-DNA 1575 ng / ml (222-170531 ng / ml) con IQ 25-75 (902-754650), **la mediana de ambos grupos 2639 ng / ml, este biomarcador fue evaluado como factor de impacto en la recaída tanto en el ADN tumoral con un valor p de 0,016 como en el ct- ADN con un valor p de 0,05, así como en la respuesta a la quimioterapia con un valor p de 0,092, con una sensibilidad de 47 % y especificidad del 99%.** Se analizó la supervivencia libre de eventos global, cuya mediana es de 40 meses con un valor de p 0.058, no se alcanzó la mediana de supervivencia global y la media es de 40 meses. Conclusiones: La presencia de la mutación EZH2 es un biomarcador que impacta en la recaída de los pacientes con LDCBG.

MARCO TEORICO

El linfoma difuso de células grandes B (LDCGB) es el subtipo de linfoma no Hodgkin (LNH) más frecuente. La organización mundial de la salud (OMS) lo define como una neoplasia de células linfoides B grandes, con un núcleo de tamaño equivalente o mayor al núcleo de los macrófagos, o más de dos veces el tamaño de un linfocito normal, dentro de un patrón de crecimiento difuso.(1)

Epidemiología.

En Estados Unidos de América (EUA) en el 2012 se reportaron 70,130 nuevos casos de linfoma no Hodgkin, con un aproximado de 18,940 muertes (2). Más de dos terceras partes de los casos se diagnosticaron en pacientes mayores de 60 años. En Gran Bretaña es la 5ª causa de cáncer, sin preferencia de género. De los LNH el LDCGB es el más común, representa el 30%, no tiene una distribución geográfica específica (3).

En México, el reporte del GLOBOCAN 2018 ubica al LNH en la 10ª causa de cáncer con 6848 casos por año y una mortalidad de 3071 casos en ese año, es decir la 10ª causa de muerte por cáncer. Siendo más frecuente en hombres con 6.4 por 100.000 casos que en mujeres con 3.8 por 100,000 casos (4). En el Instituto Nacional de Cancerología se diagnosticaron y trataron 240 casos nuevos de LDCGB en el periodo de abril de 2011 a diciembre de 2012; así como 139 casos nuevos en el 2013.

Características Clínicas

El LDCGB se presenta de manera agresiva, con una rápida evolución caracterizada generalmente por aumento de volumen de una o varias tumoraciones ya sean a nivel ganglionar o extra ganglionar. Siendo el tracto gastrointestinal (estómago y región ileocecal) el sitio más común de actividad extranodal, sin embargo otros sitios de afección son hueso, testículos, bazo, anillo de Waldeyer, glándulas salivales, tiroides e hígado. La infiltración en la médula ósea se reporta de un 11 a 27% de los casos. Los síntomas se presentan dependiendo del tamaño y sitio de afección del tumor (1). Como se detalla en el apartado de tratamiento, esta neoplasia es altamente curable (hasta 90 %)

La presencia de comorbilidades es frecuente en pacientes con neoplasias, siendo las más comunes la diabetes y la hipertensión arterial. La Diabetes Mellitus se asocia con riesgo elevado de cáncer y una supervivencia inferior, se realizó un estudio con 153 pacientes (19.71%), recién diagnosticados cuyos tratamientos incluían rituximab, se identificaron ciento nueve pacientes con diabetes mellitus preexistente (19.71%), y se asoció a supervivencia libre de progresión y supervivencia global desfavorable especialmente en los pacientes \leq de 60 años, IPI 0-2 puntos, síntomas B, y Lactato deshidrogenasa \leq límite superior de lo normal. (5)

La hipertensión arterial está asociada con el desarrollo de varias neoplasias que incluyen pulmón, mama, piel, colon, estómago, vejiga, recto, próstata, páncreas, esófago, ovario, cérvix, riñón, melanoma, leucemia, linfoma y mieloma, aunque el tratamiento hipertensivo disminuye la morbilidad cardiovascular se registró en una serie asiática de 410 casos la presencia de hipertensión en 9.5%. (6)

Factores de pronóstico clínico

El índice pronóstico internacional (IPI) se describió en 1993 y evaluó inicialmente a 3,273 pacientes con diagnóstico de LNH agresivo. En este índice pronóstico, la edad (\geq 60 años), la etapa clínica (III/IV), la elevación de deshidrogenasa láctica (DHL), el estado físico del paciente (medido por la escala de ECOG) y el número de sitios extranodales afectados ($>$ 1), demostraron tener un impacto en el pronóstico, con lo cual se establecieron los siguientes grupos de riesgos relacionados con la supervivencia (7). *Tabla 1.*

Tabla 1. Índice pronóstico internacional		
Grupo de Riesgo	Variables desfavorables	
	Todos los pacientes	Pacientes \leq 60 años*
Bajo	0-1	0
Intermedio bajo	2	1
Intermedio alto	3	2
Alto	4-5	3

*En pacientes \leq 60 años de edad, el índice pronóstico internacional ajustado a la edad (IPI_{ae}), se calcula con tres variables desfavorables: mal estado general, estadio de Ann Arbor avanzado y DHL elevada.

El estudio correlacionó las distintas variables con la respuesta global, supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global. Además, en un subanálisis en los pacientes menores de 60 años, se ajustó una escala a edad (7) *Tabla 2.*

Tabla 2. IPI y su impacto pronóstico			
Grupo de Riesgo	Respuesta global (%)	Supervivencia libre de recaída (5 años)%	Supervivencia Global (5 años)%
IPI, todos los pacientes			
Bajo	87	70	73
Intermedio Bajo	67	50	51
Intermedio Alto	55	49	43
Alto	44	40	26
IPI, ajustado por edad (≤ 60 años)			
Bajo	92	86	83
Intermedio Bajo	78	66	69
Intermedio Alto	57	53	46
Alto	46	58	32

Si bien durante años el IPI demostró ser muy útil para discernir a pacientes con alto riesgo, fue desarrollado antes de la inclusión de rituximab en los regímenes terapéuticos. Con lo cual surgieron diferentes dudas acerca su aplicación en pacientes bajo este tratamiento. Fue entonces que Sehn y cols, realizaron un análisis retrospectivo de 365 pacientes con LDCGB de nuevo diagnóstico tratados con rituximab y quimioterapia estándar. En este estudio se redistribuyeron los factores del IPI en 3 grupos del denominado IPI revisado (R-IPI) (8). *Tabla 3.*

Tabla 3. IPI revisado y su impacto pronóstico				
Grupo de riesgo	No. de factores IPI	de	Supervivencia libre de enfermedad a 4 años (%)	Supervivencia global a 4 años (%)
Muy bueno	0		94	94
Bueno	1,2		80	79
Malo	3,4,5		53	55

Recientemente Advani y cols. revisaron la aplicación de IPI y R-IPI en pacientes mayores de 70 años proponiendo un nuevo ajuste del parámetro de la edad en la escala IPI, con el objeto de establecer un pronóstico más real en pacientes de mayor edad, reportando supervivencia libre de recaída para bajo, intermedio bajo, intermedio alto y alto a 3 años de 77%, 62%, 47% y 28% respectivamente; así mismo la supervivencia global a 3 años fue de 86%, 74%, 58%

y 36%, respectivamente; sin embargo aún faltan estudios que permitan validar esta nueva propuesta (9).

Recientemente, un grupo de autores del MD Anderson Cancer Center (9) han señalado la importancia pronóstica de la cuenta absoluta de monocitos y linfocitos en pacientes con linfoma difuso de células grandes B, aún después de ajustarse por IPI. Pacientes con IPI 0-1 tienen una supervivencia global a 22 meses de 88%, que ajustada con estos valores separa 3 grupos con supervivencia de 92 %, 89 % y 80%. Estos hallazgos se han confirmado por otros grupos (10).

Histología:

En el aspecto morfológico, el LDCGB se caracteriza por presentar un patrón difuso de proliferación de células linfoides grades que sustituyen parcial o totalmente la arquitectura normal del ganglio o tejido linfóide examinado. Existe comúnmente infiltración perinodal, además de bandas escleróticas. No obstante el LDCGB es una entidad clínico-patológica muy heterogénea. La revisión de los tumores hematológicos de la OMS de 2008 reconoció la existencia de múltiples variantes morfológicas del LDCGB (1): centroblastico, inmunoblastico y anaplásico. Se clasifican en dos subgrupos moleculares: de célula B activada y tipo centrogerminal.

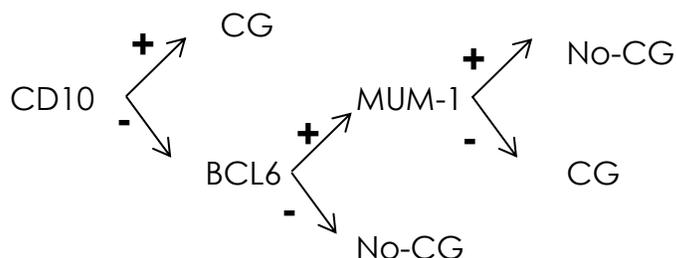
Otro aspecto importante que ha sido descrito es la importancia del microambiente en el comportamiento de la enfermedad. En casos de LDCGB se han descrito dos patrones de expresión del microambiente; estroma-1 de pronóstico favorable, donde hay depósito en la matriz extracelular y mayor presencia de infiltración por histiocitos; el estroma-2 de pronóstico desfavorable, donde hay compromiso de los genes de las células endoteliales que se refleja en un incremento en la densidad de vasos sanguíneos a nivel tumoral, con mayor angiogénesis (11) Ya que las diferencias en el origen y la expresión genética del LDCGB ha demostrado tener un impacto pronóstico y terapéutico, es importante establecer su diferencia al diagnóstico. No obstante dada la dificultad de realización en la práctica de los estudios de expresión genética, se han investigado y validado patrones de inmunohistoquímica que se correlacionan con los diferentes subtipos biológicos de LDCGB (11).

Inmunofenotipo

Las células neoplásicas expresan marcadores comunes a las células B, como CD19, CD20, CD22 y CD79a, sin embargo pueden perder alguno de éstos. En el 50 a 70% de los casos se encuentra una inmunoglobulina ya sea de superficie o citoplasmática (IgM>IgG>IgA). CD30 se puede expresar, especialmente en la variante anaplásica. También se ha encontrado en un 10% de los casos la expresión de CD5, donde el LDCGB es de novo y en muy contados casos secundario a una leucemia linfocítica crónica (LLC), siendo importante establecer el diagnóstico diferencial con linfoma del células del manto donde habrá además coexpresión de CD5 y ciclina D1 (1)

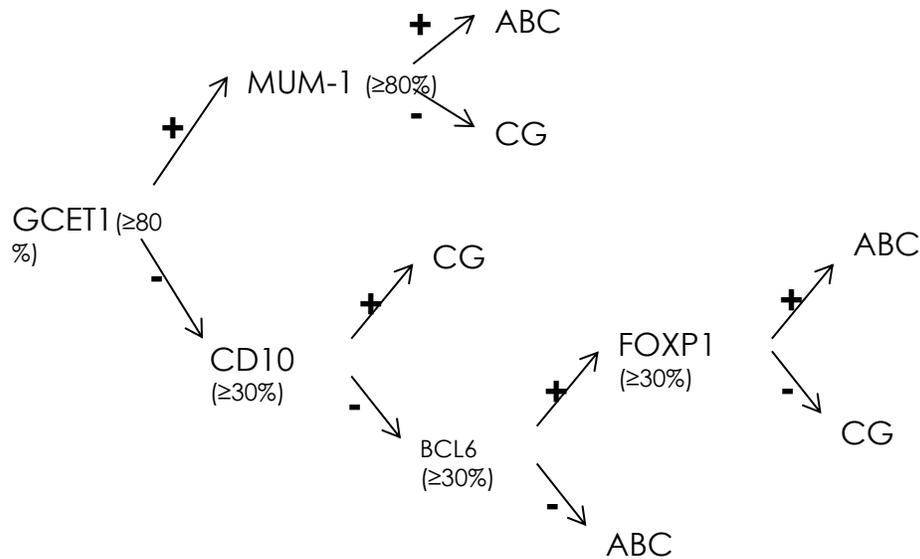
Existen diferentes reportes en cuanto a la incidencia de la expresión de *CD10*, *BCL6* e *IRF4/MUM1*. En el caso de CD10 se ha encontrado en un 30-60% de los casos, *BCL6* de un 30-90% e *IRF4/MUM1* en un 35-65%. La expresión de *FOXP1* se ha reportado en LDCGB que pierde sus características centro germinales y expresa *IRF4/MUM1*. La fracción de proliferación se determina mediante ki67, el cual usualmente es alto, más de 40% e incluso puede llegar a ser >90% (1)

En el 2004 Hans y cols, publicaron un algoritmo basado en la expresión de *CD10*, *BCL6* y *MUM1* que permite discernir de un linfoma centro germinal y un no centrogerminal, aplicado a 152 muestras con diagnóstico de LDCGB (12):



La sensibilidad del algoritmo publicado por Hans fue de 71% en el caso del LDCGB CG y de 88% en LDCGB NCG, con un valor predictivo positivo de 87% para CG y 73% para NCG (12).

Recientemente Choi y cols. han publicado un nuevo algoritmo, que utiliza expresión de *GCET1*, *CD10*, *BCL-6*, *MUM1* y *FOXP1*, el cual tiene una concordancia con la expresión génica del 93% (13)



La sensibilidad fue de 96% para LDCGB CG y de 89% en el caso de LDCGB NCG, la especificidad de 89 y 96% respectivamente. Durante el seguimiento de los pacientes se comprobó el impacto en la supervivencia global a 3 años, el grupo de LDCG CG 87% contra 44% en los casos de LDCGB NCG, $p < 0.0001$ (13)

Otros algoritmos con sensibilidad parecida son los descritos por Tally, Colomo, Muri y recientemente el de Visco-Young (14, 15).

La supervivencia de los pacientes con diagnóstico de LDCB ha mejorado con el advenimiento de la inmunoterapia más quimioterapia convencional con el esquema R-CHOP sin embargo un porcentaje de pacientes continúan con peor pronóstico, se han estudiado proteínas claves en la linfomagénesis y su relación con la supervivencia como es el caso de Ki-67; una proteína nuclear no histona, sintetizada al comienzo de la proliferación celular, ampliamente usada en la práctica clínica para evaluar la actividad proliferativa del linfoma, se estudiaron 274 pacientes con LDCGB de novo, se establecieron cuatro grupos con diferente valor de corte de Ki-67, en los cuales Ki-67 > 60% fueron 210 (76.6%), Ki-67 > 70% 180 (65.7%), Ki-67 > 80% 122 (44.5%) y Ki-67 > 90% 58 (21,2). Se analizaron los cuatro valores de corte sin embargo disponer de Ki-67 de > 90% se asoció a menor supervivencia libre de progresión sin embargo no hubo modificación en la supervivencia global, con HR 1.9, en el grupo específico centro germinal disponer de Ki-67 $\geq 90\%$ demostró menor supervivencia libre de progresión y menor supervivencia global con ($P < 0,001$) (16).

Alteraciones citogenéticas

Cerca del 30% de los pacientes con LDCGB muestran anormalidad en el cromosoma 3, en la región 3q27, donde se codifica el gen *BCL6*, siendo esta la alteración citogenética más común en LDCGB. Translocaciones que afecten a *BCL2* como la t(14;18), reportada en linfoma folicular, se ha encontrado en un 20-30% en pacientes con LDCGB. Rearreglos del gen *Myc* se encuentran en un 10% (1).

El LDCGB de célula B activada (ABC, por sus siglas en inglés) frecuentemente reporta ganancias en 3q, 18q21-22 y pérdida en 6q21-22, mientras que en el LDCGB centro germinal (CG) es más frecuente ganancia en 12q12, t(14;18) y amplificación de 2p16 (17).

Alteraciones moleculares.

El LDCGB se desarrolla posterior a la activación de la célula B. Los estudios de expresión génica muestran que existen tres subtipos moleculares, sugiriendo un origen diferente en las etapas de maduración de la célula B. Los tres subtipos son centro germinal (LDCGB CG), de células B activas (LDCGB ABC) y primario mediastinal (LBPM). En el caso del LDCGB CG las células neoplásicas derivan de las células B centro-germinales ya que expresan genes específicos de los linfocitos del centro germinal. Por otra parte, en el LDCGB ABC, las células neoplásicas derivan del proceso de diferenciación de los linfocitos B hacia células plasmáticas, ya que las células del LDCGB ABC expresan características genéticas similares a la de las células plasmáticas, lo que se sugiere un bloqueo en el proceso de diferenciación hacia la célula plasmática (11).

En el **LDCGB CG** se han descrito mutaciones en la metiltransferasa de histona *EZH2* en un 20% de las muestras analizadas. Esta alteración no se observa en el LDCGB ABC. *EZH2* es la subunidad catalítica del complejo Polycomb PRC2 y reprime la transcripción a través de su actividad como metiltransferas de histonas, a nivel de H3K27 (18). A través de modelos murinos, recientemente se ha demostrado que mutaciones en esta metiltransferasa de histonas, en particular *EZH2*(Y641F) produce una ganancia de la actividad enzimática y acelera la génesis de linfomas que muestran características histológicas de alto grado, de un fenotipo B, con modificaciones en las vías de regulación y función de la célula B. *EZH2*(Y641F) puede colaborar con *Myc* para acelerar la linfomagénesis, lo cual muestra un papel de las mutaciones de *EZH2* en la oncogénesis (19-21).

En esta era de la medicina personalizada, la información genética es fundamental para el diagnóstico temprano ayudando a la estimación de riesgo, dirigiendo a la opción terapéutica y monitoreando la recaída de la enfermedad, por lo cual es necesario comprender los paisajes genómicos tumorales y la dinámica de la enfermedad. (22)

Los biomarcadores que reflejan las características genéticas del tumor son muy prometedores, debido a su potencial para identificar la población específica que realmente puede beneficiarse de un inhibidor molecular particular y al estudiar los mecanismos de resistencias de agentes dirigidos a mutaciones. (22)

El ADN libre de las células circulantes es vertido al torrente circulatorio periférico por células normales o tumorales que sufren apoptosis y necrosis, el acceso al ADN del tumor específico simplemente a través del plasma, suero u otro líquido corporal sin necesidad de una biopsia tumoral se le conceptualizó como biopsia líquida. (23)

Las investigaciones demostraron que los pacientes con LDCGB con mutaciones del gen de respuesta primaria de diferenciación mieloide (MYD88) respondían con frecuencia a Ibrutinib, las alteraciones de exportin-1 (XPO1) potencialmente afectan la sensibilidad a inhibidores selectivos de exportaciones nucleares (SINE como selinexor) y la activación de mutaciones EZH2 es dirigido por inhibidores de EZH2. (24)

Camus y col, diseñaron reacción en cadena de polimerasa digital (dPCR) para detectar mutaciones de los genes *XPO1*, *MYD88*, y *EZH2* utilizando ADN plasmático en pacientes con LDCGB con una sensibilidad de 0,05% con el objetivo de seleccionar el subconjunto con más probabilidades de beneficiarse de un fármaco específico dirigido. Aunque hasta ahora, ninguna evidencia de investigaciones prospectivas ha demostrado que el ctDNA pueda guiar las opciones farmacéuticas en pacientes con linfoma, estos estudios destacan el potencial de la biopsia líquida para predecir la respuesta a las terapias con agentes molecularmente dirigidos en el linfoma. (25)

Otro de los eventos patogénicos descritos en el **LDCGB ABC** es la detención en la maduración del linfocito B a célula plasmática como se observa en el silenciamiento del gen *PRMD1*, localizado en el cromosoma 6q2 (19) que codifica para la proteína Blimp-1, represora de la transcripción, la cual es requerida para la diferenciación a células plasmáticas; Otros estudios (27) han demostrado que hasta en un 25% de los LDCGB ABC tienen silenciamiento del gen *PRMD1*, que lleva a la pérdida de su consiguiente ausencia de Blimp-1. (11,26,28)

Se sabe además que *BCL6* y *SPIB* bloquean la expresión de Blimp-1, reportándose el aumento de la expresión de *BCL6* y *SPIB* en un 25% de los casos (9): Así mismo, en el LDCGB ABC se encuentra activación de la vía NF-κB constitutiva y expresión de *BCL2*, *IL6* e *IL10* (11, 26, 28)

Por otra parte, el linfoma B primario de mediastino (**LBPM**) parece tener otro origen, con un perfil de expresión génica similar hasta en un 30% con el perfil del linfoma de Hodgkin (LH) de tipo esclerosis nodular; además de que en ambos se han descrito la activación de la vía NF-κB y aberraciones genéticas como la amplificación del cromosoma 9p24 (9). También se han descrito ganancias en el cromosoma 2p14-16, el cual contiene regiones que codifican genes de *cREL* y *BCL11A*, los cuales participan en la activación de la vía NF-κB (26). El 30% de los LBPM tiene inactivo el regulador A20 de la vía NF-κB (11).

Ya que los estudios de perfil genético, aún no se han generalizado en el diagnóstico de LDCGB el uso de algoritmos en base a marcadores de inmunohistoquímica permitió de una manera más aproximada diferenciar estos linfomas (12).

El algoritmo descrito por Hans y cols (12) fue descrito previo al uso de terapia con rituximab; los estudios realizados posteriormente mostraron que utilizando este algoritmo y bajo tratamiento con inmunoterapia la supervivencia global a 3 años de 85% vs 69% ($p < 0.032$) en LDCGB centro germinal vs no centro germinal, respectivamente (29). No obstante, esto difirió de los resultados en otros estudios, ya que la concordancia del algoritmo de Hans con los estudios de perfil de expresión génica no fue mayor del 90%. Nyman y cols. (30) reportaron una supervivencia global de 77% vs 76% en pacientes con LDCGB CG vs NCG respectivamente y 68% vs 63% en cuanto a supervivencia libre de enfermedad utilizando el algoritmo de Hans, sin significado estadístico para ninguno de los puntos estudiados.

Posteriormente han surgido nuevos algoritmos diagnósticos que han demostrado mayor correlación con estudios de perfil de expresión génica, entre estos los descritos por Choi y Tally (15). El algoritmo de Choi demostró durante el seguimiento de los pacientes el impacto en la supervivencia global a 3 años, el grupo de LDCG CG 87% contra 44% en los casos de LDCGB NCG, $p < 0.0001$ (13)

Sin embargo recientemente se ha publicado una revisión de los diferentes algoritmos comparado con los perfiles de expresión génica en pacientes con LDCGB tratados con rituximab. En este estudio, realizado en 157 pacientes, ninguno de los algoritmos demostró tener poder predictivo para la supervivencia global, además de tener una pobre correlación con estudios de perfil de expresión génica (14) *Tabla 4.*

Tabla 4. Algoritmos utilizados en la diferenciación molecular de LDCGB y su correlación pronostica.					
Algoritmo	n (%)	Respuesta completa (%)	Supervivencia libre de progresión a 5 años	Supervivencia global a 5 años	Análisis estadístico en de la supervivencia global
Colomo					
CG	53(44%)	74%	48%	54%	P 0.3
NCG	68(56%)	78%	55%	62%	
Hans					
CG	61(41%)	77%	54%	60%	P 0.6
NCG	88(59%)	76%	52%	59%	
Muris					
CG	87(57%)	63%	48%	57%	P 0.2
NCG	65(43%)	51%	56%	63%	
Choi					
CG	45(33%)	32%	48%	54%	P 0.2
NCG	90(67%)	70%	52%	61%	
Tally					
CG	55(37%)	82%	63%	56%	P 0.3
NCG	92(63%)	71%	54%	47%	

Al momento de estudiar la concordancia de los algoritmos y el perfil de expresión génica ninguno fue estadísticamente significativo. No obstante al comparar la supervivencia libre de progresión a 5 años cuando se realizaban los estudios de perfil de expresión génica mediante *microarrays*, encontramos 76% vs 31% en pacientes con LDCGB CG vs ABC respectivamente, con una $p = 0.005$; así mismo también se encontró diferencia al determinar la supervivencia global a 5 años 80% vs 45% ($P = 0.03$). (14) *Fig 3.* Por cual es probable que en los siguientes años se busque realizar de manera generalizada el perfil de expresión génica, una vez que este estudio pueda ser costeable a los diferentes sistemas de salud.

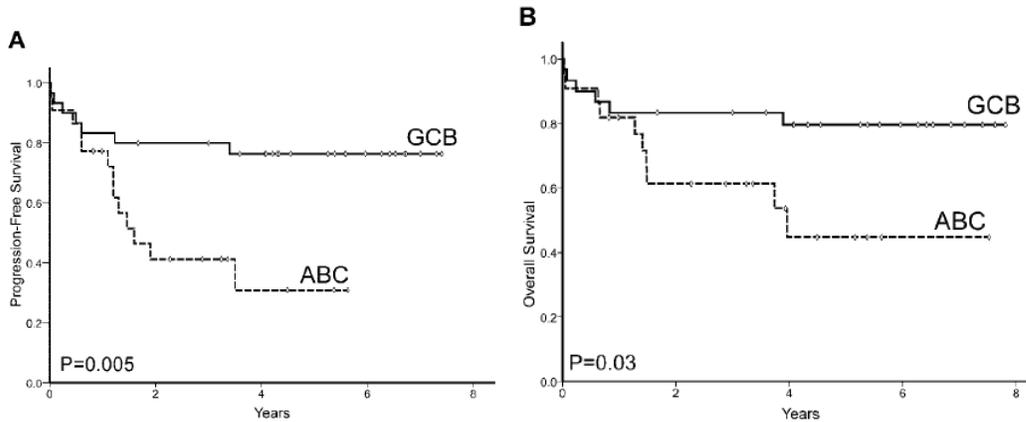


Fig3. Supervivencia libre de progresión y supervivencia global en pacientes con diferente subtipo de LDCGB basado en su perfil de expresión génica (14).

Otros factores con impacto pronóstico

El microambiente tumoral se ha clasificado en tipo 1 y 2. El tipo 1 caracterizado por infiltrado monocitoide/macrófagos relacionado con la expresión de SPARC (proteína secretora, ácida y rica en cisteína) se relaciona con un buen pronóstico, contrario al tipo 2, caracterizado por aumento en la densidad de vasos sanguíneos que reflejan una mayor actividad angiogénica, donde el pronóstico es malo (31).

Las deleciones del cromosoma 8, ejemplo del(8p23.1), del(8p) y del(8p23.1-21.2) están asociadas a un mal pronóstico, así como la trisomía del 3. Inversamente los pacientes con ganancias del 7q tienen un buen pronóstico con un comportamiento poco agresivo, la t(6;14)(p25;q32) también se ha asociado a un buen pronóstico (17).

BCL2 se encuentra sobre-expresado en un 47 a 58% de los LDCGB, su expresión en linfomas centro germinales se asocia en su mayoría a la t(14;18), sin embargo en los linfomas de células B activadas, BCL2 está sobre-expresado secundario a la vía NF- κ B y a ganancias o amplificaciones del cromosoma 18q21 (17). El impacto pronóstico es controversial ya que diferentes estudios señalan su poder predictivo, mientras otros lo descartan cuando se trata a los pacientes con quimioterapia más inmunoterapia, esto se ha visto principalmente reflejado en los linfomas centro germinales donde la expresión de BCL2 es de peor pronóstico a pesar del tratamiento con rituximab, de manera interesante ello no se refleja en los linfomas de células B activadas donde el tratamiento con rituximab ha podido reducir la diferencia de supervivencia en pacientes BCL2 positivo (32)

Las traslocaciones de MYC reportadas en 7-10% de los casos de LDCG donde se asocia a un mal pronóstico; cuando concurre con la traslocación t(14;18) *IGH/BCL2* está asociado a los linfomas relacionados a la teoría del doble “hit”, asociados a linfomas de mayor agresividad, cariotipo complejo y muy mal pronóstico (17).

Alteraciones moleculares de mal pronóstico son: mutaciones en *TP53* descritas entre un 18 a 30%; pérdida de expresión de HLA-DP y HLA-DR; un elevado Ki67 y la expresión de CD43 (17).

Entidades especiales de LDCGB como el linfoma primario de mediastino se asocia a un pronóstico similar al reportado en linfomas centro germinales, supervivencia cercana al 80%, clínicamente es más frecuente en mujeres y rara vez tiene infiltración a médula ósea. Otros subgrupos de linfomas difusos en base a la clasificación de la OMS con curso agresivo y pobres resultados son el linfoma difuso células grandes B rico en histiocitos/linfocitos T; linfoma de células grandes B intravascular; LDCGB asociado a virus de Epstein Barr; LDCGB CD5 positivo y la variante plasmablástica (17).

En los últimos diez años ha habido un importante avance en el conocimiento de la heterogeneidad biológica de esta enfermedad. Los estudios de expresión genética han puesto de manifiesto la existencia de distintos perfiles moleculares en el LDCGB con diferentes comportamientos y pronóstico, lo que ha permitido recientemente identificar nuevas dianas terapéuticas, generando el desarrollo nuevos fármacos para situaciones de refractariedad o recidiva, así como incorporarlos en tratamientos de primera línea para tratar a pacientes de alto riesgo (11).

Tratamiento

El tratamiento convencional

Tratamiento de primera línea en pacientes mayores de 60 años

En 2002, el *Grouped'Etude des Lymphomes de l'Adulte* (GELA) publicó los resultados de un estudio aleatorizado que comparaba, en pacientes >60 años con LDCGB y en primera línea, CHOP en combinación con rituximab (R-CHOP) frente a CHOP solo (26) La tasa de remisiones completas (RC) fue significativamente mayor en los pacientes tratados con R-CHOP (76% vs. 63%; $p = 0.0005$), la supervivencia libre de enfermedad (*Fig 5*) y la supervivencia global a 2 años también fueron mayores, esta última de 70 vs 57% ($p=0.007$) a favor de R-CHOP, sin

aumento de la toxicidad grado 3/4; la mayor incidencia de efectos adversos grado 1 - 2 fue en el grupo de R-CHOP, los cuales estuvieron relacionados a la infusión del rituximab. Con lo anterior, R-CHOP se estableció como esquema de elección en pacientes mayores de 60 años con linfoma difuso (33)

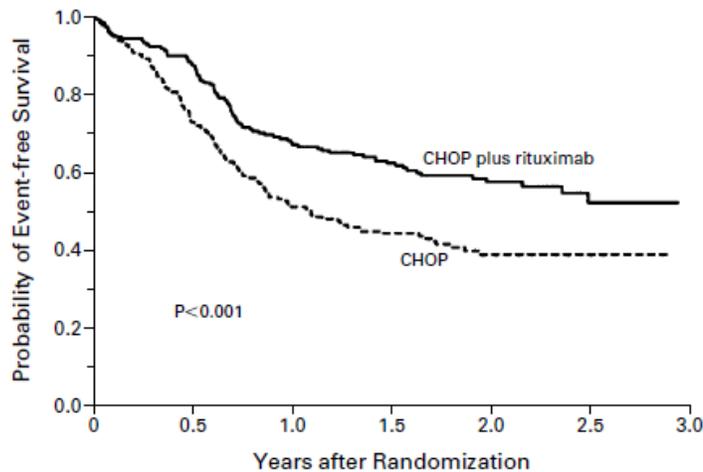


Fig 5. Supervivencia libre de enfermedad en 399 pacientes aleatorizados a CHOP vs R-CHOP. (29)

En el 2005 fue publicado por el mismo grupo el seguimiento a largo plazo del mismo estudio, donde el esquema combinado de R-CHOP sigue siendo superior a CHOP. A 5 años, la SLE fue de 47% frente a 29%, la supervivencia libre de progresión (SLP) 54% frente a 30% a favor del uso de rituximab; la ventaja se observó en ambos grupos independiente del riesgo, en pacientes con IPI bajo la SLP fue de 69 frente 34%; $p=0.00013$ y en pacientes con IPI de alto riesgo 47% frente 29%; $p=0.00078$. La supervivencia global a 5 años en los pacientes tratados con R-CHOP fue de 58% frente a 45% en los pacientes con CHOP. No se reportó diferencia en efectos adversos (34). Resultados parecidos fueron reproducidos en estudios realizados por otros grupos.

Lo siguiente a determinar era el impacto real de la densidad de dosis de quimioterapia, ya que estudios en la era pre-rituximab mostraban que CHOP cada 14 días mejoraba la supervivencia global y la supervivencia libre de progresión (35). Por lo cual el siguiente paso fue valorar estos esquemas aunado al uso del anti-CD20. Esto se revisó en el estudio RICOVER-60 en el cual se aleatorizaron 1222 pacientes mayores de 60 años a tratamiento con CHOP14 con y sin rituximab, a 6 y 8 ciclos, además de radioterapia en caso de enfermedad voluminosa. El grupo de R-CHOP14 tuvo una supervivencia global a 3 años de 78% a diferencia de CHOP14 donde solo fue de 67%, la SLE fue de 63% vs 53% respectivamente. En pacientes con respuesta parcial posterior a 4 ciclos, no hubo diferencia entre dar 6 o 8 ciclos.

Concluyendo que R-CHOP14 por 6 ciclos era superior a CHOP14 y no inferior a 8 ciclos de R-CHOP14 (36).

Sin embargo la superioridad de R-CHOP14 sobre R-CHOP21 no ha sido demostrada en estudios aleatorizados. Ensayos que comparen ambos esquemas han sido desarrollados por el grupo GELA y el grupo británico, en éste último Cunningham y cols (37) en reportes preliminares no encontraron diferencia en cuanto a porcentaje de respuestas completas y respuestas global.

En el estudio del GELA se aleatorizaron pacientes entre 60 y 80 años en dos grupos con características basales similares. La tasa de RC en el grupo tratado con R-CHOP14 fue del 67% frente a 75% en el grupo tratado con R-CHOP21, aunque las diferencias no fueron significativas. La SLE, SLP y la SG fueron peores en el grupo tratado con R-CHOP14. La toxicidad hematológica fue significativamente mayor en el grupo de R-CHOP-14, lo que supuso mayor proporción de hospitalizaciones. Sin embargo los pacientes del grupo R-CHOP14 no recibieron las medidas de soporte como el uso de factor estimulante profiláctico, que ha sido una de las principales críticas a este estudio (38).

Tratamiento de primea línea en jóvenes

Una vez comprobada la eficacia de rituximab en pacientes mayores, ensayos similares no se hicieron esperar en pacientes jóvenes; el estudio internacional MInT (Mab-Thera International Trial) que tuvo como líder al grupo alemán, comparó en pacientes de 18 a 60 años de edad con riesgo bajo e intermedio bajo (estadios II-IV con IPI ajustado a edad = 0-1, o estadio I con enfermedad voluminosa), tratados con CHOP o esquemas similares, con o sin rituximab. El grupo tratado con R- quimioterapia obtuvo mejores resultados que aquellos donde no se utilizó rituximab, la SLE a 3 años fue de 79% vs 59% ($p < 0.0001$), así como la supervivencia global 93% vs 84% ($p < 0.0001$) (39). El seguimiento de este estudio permitió además diferenciar dos grupos con diferente pronóstico, aquellos con IPI bajo favorable (IPI=0 sin enfermedad voluminosa) y otro grupo IPI bajo desfavorable (IPI=1 con o sin enfermedad voluminosa), donde la SLP a 6 años fue de 84% vs 71% respectivamente (40).

El grupo GELA llevó a cabo posteriormente un ensayo fase III donde comparaba R-ACVBP asociado a R-CHOP21, los resultados preliminares muestran mejoría la SLE y SLP a 3 años en el grupo de R-ACVBP, sin embargo con una mayor toxicidad hematológica y mucositis. Actualmente se están llevando a cabo otros estudios en este grupo de pacientes jóvenes con IPI bajo, no obstante por el momento el tratamiento estándar sigue siendo R-CHOP21 (41).

No obstante los buenos resultados con la terapia blanco, los pacientes jóvenes con IPI alto continúan siendo un reto en el tratamiento, ya que tiene un mal pronóstico, con pobres respuestas y mayor riesgo de recurrencia. Además 30% de estos pacientes desarrollan enfermedad refractaria (41).

Una de las estrategias propuestas en estos pacientes fue el uso de dosis altas de quimioterapia aunado a trasplante autólogo de células progenitoras hematopoyéticas (TauCPH), para lo cual se han realizados múltiples estudios. En 2008 se publicó un metanálisis que incluyó 15 estudios con un total de 3 079 pacientes, el cual demostró que la mortalidad relacionada con el tratamiento fue similar en los pacientes tratados con quimioterapia sola y en los tratados con quimioterapia a altas dosis. En 13 estudios, la tasa de respuesta fue significativamente mayor en el grupo de TauCPH, sin embargo, estos resultados no se tradujeron en una mejora en la SLE o en la SG (42).

Por lo cual, hasta el momento no está recomendado el uso de TauCPH como intensificación o consolidación en tratamiento de primera línea fuera de ensayos clínicos. Actualmente solo se recomienda a pacientes que no lograron la respuesta completa con el tratamiento de primera línea o aquellos con recaída (41)

Por otro lado, en fechas recientes el esquema R-EPOCH (rituximab, etopósido, vincristina, adriamicina, esteroide y ciclofosfamida) ha llamado la atención como tratamiento de primera línea en LDCGB. En el 2011 se publicaron resultados de un estudio realizado en 69 pacientes de entre 23 y 83 años, con un seguimiento a 62 meses, donde la respuesta global fue de 99%, con 84% de respuestas completas. A 5 años la supervivencia global fue de 84% y la SLE 75%. Los pacientes con LDCGB centro germinal obtuvieron mejores respuestas con una SLE 94% frente a 58% en pacientes con linfoma no centro germinal, a 62 meses. Fue bien tolerado sin toxicidades no hematológicas grado 4 reportadas (43). Por lo cual aún faltan por venir los estudios aleatorizados contra el estándar actual que es RCHOP.

Por último, otra controversia continúa siendo el papel de la radioterapia en pacientes con enfermedad localizada (estadios I o II), donde se ha demostrado que se obtienen excelentes resultados con 3 ciclos de quimioterapia combinada con rituximab seguidos de radioterapia sobre campo afectado. Pero no existen estudios aleatorizados en la era del rituximab que establezcan de forma definitiva la indicación de radioterapia en esta situación, y sigue siendo un tema controvertido. Los factores de riesgo asociados, en especial el volumen de la masa tumoral, la localización tumoral y la valoración de respuesta por PET-CT, pueden servir para

determinar utilizar o no esta estrategia. No obstante varios estudios han puesto en duda el papel de la radioterapia. Un estudio del GELA ha demostrado mejores resultados con quimioterapia intensificada (ACVBP) que con CHOP más radioterapia en campo afectado. Sin embargo, un estudio reciente del SWOG ha conseguido excelentes resultados con RCHOP x 3 seguido de radioterapia locorregional, con SLP del 88% y SG del 92%, a 4 años (44).

En general, la radioterapia se considera obligada sobre residuos de lesiones voluminosas, pero algunos estudios recientes sugieren que esta estrategia no ofrece ningún beneficio adicional en pacientes que obtienen RC tras 6 ciclos de quimioterapia, aunque puede mejorar la SLP en pacientes que no obtienen RC (41).

Tratamiento de rescate para pacientes con LDCGB en recidiva o refractario

Los pacientes en los que, por edad o comorbilidad, no exista contraindicación para la quimioterapia intensiva, el tratamiento estándar consiste en conseguir una nueva respuesta con el esquema de rescate y posteriormente intensificar con TauCPH. Un diverso número de ensayos ha revisado la consolidación con TauCPH en pacientes con recaída, reportando una media de SLP a 3 años de 35%. Esto fue demostrado desde la era pre-rituximab, donde el estudio PARMA concluyó una mejoría de los resultados en pacientes llevados a trasplante sobre aquellos que recibieron solo quimioterapia de rescate. Este estudio demostró además que los pacientes con IPI >1 y un tiempo de recaída corto (<12 meses) son de muy mal pronóstico (45,46).

La elección del mejor esquema de quimioterapia de rescate es controvertido. ICE (ifosfamida, carboplatino, etopósido), DHAP (dexametasona, cisplatino, citarabina), ESHAP (etopósido, metilprednisolona, citarabina, cisplatino), mini-BEAM (carmustina, etopósido, citarabina, melfalán), entre otros, son esquemas con resultados no muy diferentes. (47)

En general, la combinación con rituximab beneficia también a los pacientes en recaída. En la experiencia del HOVON (Hemato-Oncology Foundation for Adults in the Netherlands), en un estudio aleatorizado de DHAP con o sin rituximab, R-DHAP consiguió mayor tasa de respuesta y la SLP y la SG fueron mejores que en el brazo tratado sólo con quimioterapia (47). Rituximab no dificultó la movilización de progenitores hematopoyéticos ni el curso del TauPH posterior.

Otro estudio es el CORAL, donde se ha comparado en un ensayo multicéntrico prospectivo fase III, dos esquemas de rescate en pacientes con LDCGB en recaída. Los pacientes fueron aleatorizados para recibir R-ICE o R-DHAP, y los que obtuvieron respuesta, después de 3 ciclos de tratamiento fueron tratados con quimioterapia intensiva y TaucPH. La respuesta global (64% vs. 64%), la SLP a 4 años (26% vs. 37%) y la SG a 3 años (43% vs. 51%) con R-ICE y R-DHAP no fueron significativamente diferentes. Globalmente, la eficacia de ambos regímenes fue similar. Como hallazgo relevante en el estudio CORAL, los factores que influyeron en la SG fueron: el IPI en el momento de la recidiva, el tiempo desde el final de la primera línea hasta la recidiva y el haber o no recibido rituximab en la primera línea. De tal forma, que aquellos pacientes tratados con rituximab y que recaen en menos de un año, tienen un pronóstico realmente pobre (48).

En los pacientes que recaen después de un trasplante autólogo, el trasplante alogénico puede ser una opción terapéutica razonable. Los resultados comunicados con acondicionamiento de intensidad reducida son alentadores. Recientemente se han publicado los resultados del registro del European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT), con una SLP y una SG a 3 años de 42 y 54%, respectivamente, con una tendencia hacia mejores resultados con los regímenes de intensidad reducida (49).

La introducción de nuevas terapias también se ha realizado en este ámbito, donde el uso de un anti-CD20 aunado a un radiofármaco es una opción de tratamiento en el acondicionamiento o tratamiento de inducción en pacientes con recaída. Existen estudios con 90Y-ibritumomab tiuxetan en combinación con dosis altas de quimioterapia donde no se ha observado efecto negativo sobre el injerto y la toxicidad no es diferente a los regímenes convencionales (50). En un estudio reciente se utilizó 90Y-ibritumomab tiuxetan (0.4 mCi/kg) combinado con dosis altas de BEAM seguido de TauCPH contra solo el uso de BEAM; los resultados mostraron una mejor respuesta y supervivencia con el grupo tratado con radioinmunoterapia, supervivencia global a 2 años 91% frente a 62%, $p = 0.05$ (51).

Aproximadamente entre el 60 a 40% de los pacientes mayores de 60 años que son tratados con RCHOP experimentan recaída o refractariedad posteriores, estos no son candidatos a trasplante ya sea por edad o por comorbilidades. Por lo cual necesitan nuevos tratamiento con eficacia y menor toxicidad. Recientemente se han descrito esquemas como gemcitabine con oxaliplatino en el cual 46 pacientes que recibieron R-Gem-Ox tuvieron respuestas completas de 50%, siendo bien tolerado (52). Se recomienda que por ser un grupo de mal pronóstico estos pacientes deberán recibir quimioterapia y en cuanto sea posible ingresarlos a ensayos clínicos.

Nuevos tratamientos y estrategias para el LDCGB

La información actual y la que surge cada día con respecto a la biología de la enfermedad ha permitido subclasificar al LDCGB en diferentes entidades moleculares (GCB, ABC y LBPM) las cuales son presentadas características clínico-biológicas, mutaciones y activación de vías intracelulares diferentes; estas diferencias en las vías de señalización están permitiendo el desarrollo de terapias diana eficaces. Están en desarrollo nuevos anticuerpos monoclonales anti-CD20, inhibidores de deacetilasas de histonas, inhibidores de syk, bortezomib, inhibidores de m-TOR, enzastaurina, bevacizumab y lenalidomida, entre otros. (53)

El LDCGB de tipo ABC tiene una actividad elevada de la vía NF- κ B, que puede ser suprimida con bortezomib. Algunos estudios apuntan hacia la posibilidad de que bortezomib, en combinación con la quimioterapia convencional, pueda mejorar las respuestas en los LDCGB de tipo no-GCB.²² Bortezomib ha sido utilizado de manera segura en combinación con R-CHOP en pacientes de recién diagnóstico donde se reportan respuestas globales de 100% y RC de 86% con una SLP a 2 años de 64% y una supervivencia global de 70% (53). Están en marcha estudios aleatorizados para validar esta estrategia.

Los agentes inmunomoduladores (IMiDs) como la lenalidomida puede inducir respuestas en LDCGB; estos inhiben la angiogénesis y al factor de necrosis tumoral alfa, estimulan la respuesta inmune e inhiben otras interleucinas (ej. IL-12), además de inducir apoptosis. Todo lo anterior llevo a probar lenalidomida como agente único en 73 pacientes con recaída/refractarios obteniendo una respuesta global de 29%, con una toxicidad moderada, principalmente hematológica (54) En otra serie de 49 pacientes la respuesta fue de 35% (59). Por lo cual actualmente el grupo italiano está llevando a cabo un estudio fase II donde se combina lenalidomida con R-CHOP (LR-CHOP21) en pacientes de edad avanzada con IPI de alto riesgo. Una nueva línea de investigación es el mantenimiento para pacientes con alto riesgo de recaída y no candidatos a intensificación con TauPH. (59)

Otra vía que está siendo estudiada como blanco terapéutico es la de PI3K/Akt/mTOR. El mecanismo de acción de los inhibidores de mTOR no está del todo claro, al parecer incluye desde autofagia, anti-angiogénesis, inmunoregulación entre otros. De los inhibidores mTOR de primera generación se estudió everolimus como agente único en varios linfomas, encontrando respuestas globales de 30% (60). Actualmente se están llevando estudios en combinación con quimioterapia.

Otro fármaco en estudio es la enzastaurina, un inhibidor de proteínquinasa C beta (PKC β) que se administra por vía oral y que parece tener un buen perfil de toxicidad. Actualmente se está ensayando en combinación con inmunoterapia y como tratamiento de mantenimiento. También están en estudio fármacos que actúan bloqueando la señalización del receptor de la célula B (BCR) mediante la inhibición de syk, lo que puede resultar efectivo en algunos casos de LDCGB del tipo ABC (41).

Se han desarrollado nuevos anticuerpos monoclonales frente a CD20, como ofatumumab o GA101, y frente a otras dianas como epratuzumab (CD22), galiximab (CD80) o lexatumumab (TRAIL). La integración de estos nuevos monoclonales en las estrategias de tratamiento del LDCGB está por determinar. (60)

Finalmente, los inhibidores de desacetilasas de histonas actualmente se encuentran ya dentro de las recomendaciones de tratamiento en los linfomas T, sin embargo hay observaciones que sugieren que este grupo de medicamento puede ser de uso terapéutico linfomas de células B, ya que se ha observado alta expresión de HAT1 y HDAC1 en LDCGB donde se correlaciona con un mal pronóstico (60). Por lo anterior, actualmente se están llevando estudios respecto al beneficio de estos medicamentos en pacientes con LDCGB.

El potenciador del homólogo 2 de zeste (EZH2) es un gen conservado evolutivamente identificado en muchas especies, que comparte motivos y dominios estructurales similares. Como histona metiltransferasa, EZH2 se ha identificado como una sub unidad catalítica de complejo represivo polycomb 2 (PCR2), cataliza la trimetilación de histona H3 en la lisina 27 (H3K27me) para regular la expresión génica mediante maquinaria epigenética. EZH2 también funciona como supresor transcripcional y coactivador transcripcional, dependiendo de H3K27me3 o no, y de los diferentes contextos celulares. Numerosos estudios han destacado el papel de EZH2 en el desarrollo y progresión del cáncer. A través de la modulación de la expresión genética crítica, EZH2 promueve la supervivencia celular, la proliferación, invasión y resistencia a los fármacos de las células cancerosas desde el epitelio mesenquimal. También tiene un papel decisivo en las células inmunitarias (por ejemplo, células T, células NK, células dendríticas y macrófagos) que son componentes esenciales en el microambiente tumoral. (60)

El gen EZH2 humano se encuentra en el brazo largo del cromosoma 7 en 7q35 y codifica una proteína de 746 aminoácidos, EZH2 se organiza en varios dominios: el dominio SET conservado en el extremo de C-terminal funciona para mantener la actividad de la histona metil transferasa (HMT), el dominio CXC y el dominio ncRBD son necesarios para las interacciones con otros componentes del complejo PRC2y proteínas reguladoras. Dentro de sus funciones actúa como supresor transcripcional y coactivador transcripcional, dependiendo de su interacción con los otros componentes PCR2 o no y en diferentes contextos celulares. La sobreexpresión como las mutaciones con pérdida de la función del gen EZH2 se detecta en síndrome mielodisplásico, leucemia mieloide aguda sugiriendo que puede funcionar como gen supresor de tumores o como oncogén en las neoplasias mieloides. Estudios recientes han demostrado que se observan mutaciones somáticas en el gen EZH2 en tipos específicos de cáncer, se han identificado mutaciones puntuales heterocigotas que afectan la tirosina 641(Y641) dentro del dominio SET catalítico C-Terminal de EZH2 en linfomas de células B (Linfoma difuso de células grandes B en 22%, Linfoma folicular en 7-12% de los casos), en el análisis funcional ha demostrado que esta mutación media la ganancia de función enzimática de EZH2 que conduce a niveles aumentados de H3K27me3 y da como resultado la supresión de la expresión génica (por ejemplo TCF4, FOXP1, TCL1A, BIK, RASSF6P, CDKN1A) en linfomas. (60)

Souroullas et al demostraron que la mutación somática de ganancia de función de EZH2 (Y641F) en el linfoma y en el melanoma inducen una gran reorganización de la estructura de la cromatina, induciendo tanto como la represión como la activación de los loci regulados por el polycomb. (60)

En el Instituto Nacional de Cancerología se realizó de forma inicial un estudio con el nombre un estudio de cohorte del impacto pronóstico de las mutaciones del exón 16 EZH2 en una población mexicano-mestiza de pacientes con linfoma difuso de células B grandes, teniendo como objetivo estudiar el impacto pronóstico de las mutaciones del exón 16 potenciador de zeste homólogo 2 (EZH2) en pacientes con LDCBG. Métodos: Cohorte de pacientes con LDCBG tratados entre 2015 y 2017. Se analizó la presencia de mutaciones EZH2 y su asociación con respuesta clínica (RC), recaída, supervivencia libre de progresión (SLP) y supervivencia global (SG). Resultados: Se incluyeron un total de 198 pacientes; de ellos, 30 (15,2%) tenían mutaciones en el codón 641, en el exón 16 de EZH2. La respuesta se logró en 151 de los pacientes (76,3%) y 43 (21,7%) recayeron o progresaron durante el seguimiento. (61)

Las mutaciones EZH2 se asociaron con recaída / progresión (cociente de riesgo [RR] 1,18; IC del 95%: 0,98-1,42; $p = 0,031$) mientras que se observó una tendencia a no lograr una respuesta completa (RR: 0,876; intervalo de confianza [IC] del 95% 0,74 –1,038; $p = 0,071$). (61)

Es de destacar que las mutaciones Tyr641His y Tyr641Ser EZH2 se asociaron con una SSP más corta (índice de riesgo 3,234; IC del 95%: 1,149–9,1; $p = 0,026$). (61)

Concluyendo que la presencia de mutaciones EZH2 se asocia negativamente con recaída / progresión y mostró una tendencia a la falta de respuesta completa. Se necesitan más estudios para definir mejor la importancia pronóstica de estas mutaciones en pacientes con LDCBG mexicano-mestizo. (61)

El término biopsia líquida significa acceder al ADN del tumor a través de una muestra de sangre sin la necesidad de una biopsia de tejido invasiva. Los fragmentos libres de células de ADN (cf-DNA) son vertidos al torrente sanguíneo por las células que sufren apoptosis y circulan a baja concentración en el plasma como fragmentos de ADN de doble hebra que son predominantemente cortos (<200 pares de bases) (62)

La cantidad total de cfDNA en pacientes con linfoma siempre aumenta en comparación con sujetos sanos de la misma edad y sexo, con una concentración media de 30 ng / ml de plasma. Los niveles de ADN tumoral circulante (ADNct) varían entre los diferentes subtipos de linfoma, siendo más altos en los linfomas agresivos que en los linfomas indolentes. (63)

El linfoma no Hodgkin es un grupo heterogéneo de tumores con excelentes pronóstico con los planes terapéuticos actuales. Linfomas agresivos, como difusos. Los linfomas de células B grandes tienen una tasa de curación del 70% con quimioterapia con múltiples agentes. (64) Con una comprensión cada vez mayor de la biología tumoral y el desarrollo de agentes dirigidos, existe la oportunidad de mejorar aún más estos resultados. La determinación de la biología molecular del tumor requiere una muestra de tejido. (64)

Con el desarrollo de técnicas para identificar el ADN tumoral circulante como medio para obtener información sobre biología molecular, respuesta a la terapia y enfermedad mínima residual. (65)

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El linfoma difuso de células grandes B (LDCGB) es el subtipo de linfoma no Hodgkin (LNH) más frecuente. La organización mundial de la salud (OMS) lo define como una neoplasia de células linfoides B grandes, con un núcleo de tamaño equivalente o mayor al núcleo de los macrófagos, o más de dos veces el tamaño de un linfocito normal, dentro de un patrón de crecimiento difuso.(1)

Es un linfoma agresivo, con altos índices de proliferación que nos obligan cada día a emplear herramientas diagnósticas y terapéuticas para su manejo por lo cual realizamos el siguiente estudio en el que evaluamos el impacto pronóstico de las mutaciones del codón 641 de EZH2 en el exón 16, en ADN circulante y lo comparamos con la mutación en codón 641 de EZH2 en el exón 16 ADN tumoral en pacientes tratados con esquema CHOP- Rituximab en el Instituto Nacional de Cancerología.

JUSTIFICACION

El linfoma no Hodgkin se encuentra dentro de las 10 primeras causas de muerte por cáncer en países desarrollados (2). En México es la 10ª causa en hombres y la 11ª en mujeres, por lo cual representa un problema de salud (4). El linfoma difuso de células grandes B es el más frecuente de los LNH, representando cerca de la tercera parte de los casos (1). El Instituto Nacional de Cancerología es un centro de referencia nacional y atiende anualmente más de 200 casos nuevos con esta entidad.

Se realizó previamente un estudio dentro de nuestra unidad con clara diferencia en la supervivencia global de los pacientes con mutación en ADN tumoral, queremos evaluar la presencia de ADN circulante en estos pacientes y comparar los resultados con los obtenidos previamente en tumor, valorar su impacto en la supervivencia libre de evento, supervivencia global, así como la especificidad y sensibilidad de esta prueba diagnóstica en los pacientes con recaída, ya que si bien existen numerosos ensayos que muestran los resultados en pacientes con LDCGB, estos están descritos en su mayoría en una población anglosajona, de la cual distamos mucho en características no solo físicas, sino de expresión genética.

El conocer los factores de pronóstico que impactan en los resultados obtenidos en nuestros pacientes es el primer paso para emprender posteriormente estudios que nos permitan definir el origen de las variaciones que pudiéramos encontrar. Todo con la finalidad de mejorar los resultados y proporcionar una mejor atención de la salud en nuestra población.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL.

Evaluar el impacto pronóstico de las mutaciones del codón 641 de *EZH2* en tejido tumoral y ADN circulante de pacientes con linfoma difuso de células grandes B en pacientes con linfoma difuso de células grandes B tratados con el esquema CHOP-Rituximab en el Instituto Nacional de Cancerología.

Objetivos específicos.

1. Describir las características clínicas y frecuencia de mutaciones del codon 641 de *EZH2* en tejido tumoral y ADN circulante de la población estudiada.
2. Evaluar la sensibilidad y especificidad de la determinación de mutaciones de *EZH2* en ADN circulante.
3. Identificar el impacto de las mutaciones del exon 16 de *EZH2* en la respuesta y supervivencia libre de evento y global

HIPOTESIS O LINEAMIENTOS

Hipótesis 1:

H1: Las mutaciones del codón 641 de *EZH2* tienen un impacto negativo en la respuesta y supervivencia de paciente con linfoma difuso de células grandes B.

Hipótesis nula:

Las mutaciones del codón 641 de *EZH2* no tienen un impacto en la supervivencia de paciente con linfoma difuso de células grandes B

Hipótesis 2:

H2: La sensibilidad y especificidad de la determinación de mutaciones del codón 641 de *EZH2* en ADN circulante es mayor al 90 %.

Hipótesis nula:

La determinación de mutaciones del codón 641 de *EZH2* en ADN circulante es menor al 50 %.

MATERIAL Y METODOS.

Diseño del estudio:

Estudio de cohorte (observacional, prospectivo, abierto, exploratorio, comparativo, analítico).

Universo de pacientes:

Pacientes consecutivos con diagnóstico reciente de linfoma no Hodgkin variedad difuso de células grandes B que hayan sido diagnosticados, reciban tratamiento y seguimiento en el Instituto Nacional de Cancerología de México por parte del departamento de hematología, que cumplan con los criterios de inclusión y no sean descalificados por los criterios de exclusión y eliminación, serán considerados para reclutamiento.

Procedimiento de entrada al estudio

Se obtuvo consentimiento informado de todos los pacientes.

Criterios de inclusión:

1. Haber firmado el formato de Consentimiento informado
2. Diagnóstico histopatológico de: linfoma difuso de células grandes B mediante biopsia de ganglio linfático.
3. Edad: mayor de 18 años.
4. Género: Varón, mujer.
5. ECOG: 0-2.
6. Tener enfermedad medible por PET-CT basal
7. Función hepática, renal y hematológica con los siguientes criterios:
 - a. Hemoglobina > 10 gr/dl
 - b. Neutrófilos > 2000 cel/mm³
 - c. Plaquetas > 100,000 cel/mm³
 - d. Creatinina sérica < 1.5 veces el valor normal
 - e. TGO y TGP < 3.0 veces el valor normal BT < 3.0 veces el valor normal
 - f. Fosfatasa alcalina < 3.0 veces el valor normal
 - g. Niveles de seralbumina preterapéutica
 - h. Niveles de proteína C reactiva preterapéutica
8. Pacientes sin tratamiento antineoplásico previo.
9. Candidatos a ser sometidos a quimioterapia de primera línea con intento curativo
10. En las mujeres de edad fértil, que acepten emplear un método anticonceptivo útil y aprobado.

Criterios de exclusión

1. Participación concomitante en otro estudio de investigación
2. Haber recibido cualquier tratamiento previo de quimioterapia, inmunoterapia, terapia biológica, o transcripcional, radioterapia, corticoesteroides o cualquier otra local en los 28 días anteriores a su inclusión al estudio.
3. Tener un diagnóstico de otra neoplasia en los 5 años previos.
5. Contraindicación para recibir alguno de los fármacos del estudio, como seropositividad para hepatitis B, hepatitis C.
6. Seropositividad para VIH, ya que la administración de quimioterapia puede disminuir la cuenta de CD4 y ello favorecer la adquisición de infecciones oportunistas.
7. Otra enfermedad concomitante descontrolada o infecciosa bajo tratamiento con antibióticos, antivirales o antifúngicos que contraindique el uso de quimioterapia.
10. Embarazo o lactancia.
12. Negación o incapacidad para utilizar un método anticonceptivo eficaz.

Criterios de eliminación:

1. Pacientes con fracción de expulsión del ventrículo izquierdo menor al 50 %, evaluada por MUGA.
2. Pacientes con pérdida de seguimiento (que no regresan al ciclo 2 de tratamiento) o tratamiento no evaluable por falta de adherencia al mismo.
3. Pacientes que no cuenten con estudios PET/CT basal y al final del tratamiento.
4. Linfoma difuso de células grandes B primario de sistema nervioso central.

Tratamiento:

El tratamiento no constituye parte del diseño experimental, pero todos los pacientes recibirán 6 -8 ciclos de quimioterapia con CHOP + rituximab, ya que es el tratamiento estándar para estos pacientes y éste será cubierto por el seguro de gastos catastróficos. Los pacientes en etapas clínicas I y II, de manera estándar reciben 6 ciclos y los pacientes en etapas clínicas III y IV recibirán 8 ciclos de tratamiento.

El régimen CHOP-R consiste en:

- Ciclofosfamida, 750 mg/m² I.V, día 1,
- Doxorubicina, 50 mg/m² I.V., día 1,
- Vincristina, 1.4 mg/m² I.V. hasta un máximo de 2 mg como dosis total, día 1
- Prednisona, 100 mg /diarios vía oral, días 1 al 5.
- Rituximab: 375 mg/m² I.V. el día 1

En todos los casos

Variables a evaluar:

1.-Variable dependiente: Supervivencia libre de progresión.

Categorías: Remisión de la enfermedad y enfermedad persistente

Tipo de variable: Cualitativa discreta

Escala de medición: nominal dicotómica.

Esta se evaluó con los criterios internacionales estándares de Deauville por PET-CT (51)

El reporte de PET/CT se tomó del expediente clínico con informe oficial por Médico Adscrito de especialidad en oncología nuclear e imagen molecular con experiencia en la interpretación de este tipo de estudios en una estación de trabajo Leonardo (Siemens) equipada con el software Syngo v.2009 (Siemens), subsecuentemente se hará la comparación de los resultados de los estudios PET/CT los cuales servirán para determinar, primero las lesiones medibles y segundo la magnitud del cambio porcentual de la captación del radiotrazador expresado en SUVmax trazando una región de interés sobre las lesiones medibles, así mismo se determinara el SUVpromedio de la captación hepática trazando una región de interés sobre el lóbulo derecho del hígado lo cual determinara si ambos estudios son comparables entre sí.

2. Variables independientes.

Se evaluaron las siguientes variables:

- Clínicas.
 - Edad
 - Género
 - Estado físico del paciente por escala de ECOG
 - Presencia de síntomas B
 - Estadio clínico por Ann Arbor
 - Infiltración a médula ósea
 - Niveles de deshidrogenasa láctica
 - Niveles de beta-2 microglobulina
 - Citometría hemática
 - Cuenta de monocitos absolutos
 - Niveles de seralbumina preterapéutica
 - Número de sitios extranodales involucrados.
 - Índice de masa corporal.
 -

- Histopatológicas.
 - Expresión por inmunohistoquímica de: MUM-1, CD10, BCL-6, BCL-2, Myc.
 - Índice de proliferación, evaluado por el porcentaje de células Ki67 positivas.
 - Alteraciones del microambiente:
 - Estroma tipo 1 vs tipo 2.
 - Variantes del tipo de linfoma difuso de células grandes: centroblástico, inmunoblástico, anaplásico.
 - Tipo de LDCGB, clasificado con el nomograma de Hans: centro germinal, de célula B activada.

- Alteraciones epigenéticas.
 - Mutaciones en EZH2:
 - 641 en el exón 16 en tejido tumoral y ADN circulante.

Técnica de inmunohistoquímica

Todas las pruebas se corrieron en el equipo automatizado Benchmark ULTRA (Ventana) con el siguiente protocolo:

1. Seleccionar un bloque de tejido fijado en formol amortiguado al 10% y embebido en parafina
2. Realizar cortes de 2 μ m y colocar en laminillas cargadas
3. Desparafinar
4. Hacer un calentamiento previo de la laminilla a 72°C desde médium temperaturas
5. Acondicionador celular
6. ULTRA conditioner #1
7. Calentar la laminilla a 95°C, e incubar 8 minutos
8. ULTRA CC1 por 20 minutos
9. Calentar la laminilla a 36°C, e incubar 4 minutos
10. Agregar anticuerpo (100 – 150 μ l)
11. Aplicar una gota de PREP KIT 5
12. Colocar coverslip e incubar 20 minutos
11. ULTRA wash
12. Teñir con hematoxilina 30 segundos
13. Colocar cubreobjetos (montar)

Nota. Los pasos 3 al 12 los realiza de manera automática del equipo.

Se utilizarón los siguientes anticuerpos primarios, que ya han sido previamente evaluados con el equipo de ventana, disponible en el INCAN:

Anticuerpo	Clona	Marca
CD 10	56C6	BioSB
BCL-2	124	Dako
BCL-6	PG-B6p	Dako
MUM1	MUM1p	Dako
Ki-67	SP6	BioSB
Myc	Y69 (Catálogo 1472-1)	Epitomics

De acuerdo al criterio de los patólogos se considerarán:

- + tinción tenue
- ++ tinción fuerte
- +++ tinción intensa

Como controles negativos se utilizará linfocitos de donadores voluntarios.

Mutaciones de EZH2.

Se extrajo DNA del tejido tumoral, por el por el método de proteinasa K. En resumen: se realizaron cortes de 5-8 uM, que después de desparafinarón, se añadió buffer de extracción de DNA y proteinasa K, se homogeneizará y se dejará precipitar a 55 °C. Posteriormente se añadió un volumen de fenol: cloroformo (1:1) y se centrifugó. Se recuperó la fase acuosa superior y se adicionó un volumen igual de cloroformo. Después de recuperar la fase acuosa, se precipitó con un volumen de isopropanol y NaCl 5M, se mezcló por inversión suave y se dejó precipitar a -20°C por 12 hrs. Se centrifugó y se decantó el sobrenadante. El botón de DNA se lavó con etanol y se centrifugó, para decantar el sobrenadante y también la evaporación del alcohol excedente. El DNA se resuspendió con TE; se cuantificó por espectrofotometría y se almacenó a -20°C

El DNA extraído se amplificó por PCR con los siguientes primers:

EZH2-E16-S	GTGCCCAATTACTGCCTTAGA
EZH2-E16-AS	TCCAATCAAACCCACAGACTTAC

El producto obtenido se analizó por secuencia, para evaluar las mutaciones de EZH2 en la posición 641 del exón 16.

Extracción del ADN circulante:

Se utilizó el Kit de QIAGEN QIAmp Circulating Nucleic Acid, y se realizó de acuerdo con las instrucciones del proveedor, que en resumen son: La muestra de plasma de 5 ml, se centrifugará a temperatura ambiente, posteriormente se adicionará Buffer ACL y se pasa a agitación en vortex por 30 segundos. Se incuba a 60 °C por 30 minutos. Se adiciona Buffer ACB para obtener un lisado y se pasa en vortex durante 15-30 segundos. El lisado se incuba con Buffer ACB y se deja sobre hielo para estabilizar durante 5 minutos.

Se transfirió a la columna QIAmp Mini column, y ésta se conecta a la bomba de vacío, se añade el buffer ACW1 y se libera la presión. Finalmente se adicionan 750 µL de etanol al 96%-100 % y se remueve el tubo colector.

El ADN circulante, se cuantificó y se amplificó por PCR con los primers señalados anteriormente. El producto obtenido se analizó por secuencia, para evaluar las mutaciones de EZH2 en la posición 641 del exón 16.

Criterios de eficacia.

Se utilizó como estándar de oro la respuesta completa de acuerdo con los criterios de Deauville al final al tratamiento. La presencia de enfermedad estable, progresión o respuesta parcial se considerarán como criterios de falla.

Estos criterios se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 1. Definiciones de Respuesta para Estudios Clínicos

Respuesta	Definición	Masas Nodales	Bazo, Bazo	Médula Ósea
RC	Desaparición de toda evidencia de enfermedad	(a) Captación de FDG o PET positivo previo a la terapia; masa de cualquier tamaño permitido si el PET es negativo (b) Captación de FDG	No palpable, que los nódulos desaparezcan	Infiltrado limpio en biopsia repetida; si es indeterminado por morfología, la inmunohistoquímica debe ser negativa.

		variable o el PET negativo; regresión al tamaño normal en la CT		
PR	Regresión de enfermedad medible y no nuevos sitios	Disminución $\geq 50\%$ en SPD de hasta 6 masas grandes dominantes; no aumento en el tamaño de los nódulos. (a) Captación de FDG o PET positivo previo a la terapia; uno o más PET positivo en sitios previamente involucrados (b) Captación de FDG variable o PET negativo; regresión en CT	Disminución $\geq 50\%$ en SPD de nódulos (para un solo nódulo en su diámetro mayor transverso); no aumento en el tamaño del hígado o bazo	Irrelevante si es positivo previo a la terapia; el tipo celular debe ser especificado.
SD	Fallo para lograr CR/PR o PD	(a) Captación de FDG o PET positivo previo a la terapia; PET positivo en sitios con enfermedad previa y no		

		nuevos sitios en CT o PET (b) Captación de FDG variable o PET negativo; no cambio en el tamaño de lesiones previas en la CT		
Enfermedad Recurrente o PD	Cualquier lesión nueva o incremento de $\geq 50\%$ de sitios previamente involucrados desde nadir	Aparición de una nueva lesión(es) > 1.5 cm en cualquier eje, $\geq 50\%$ de incremento en SPD de más de un nódulo, o $\geq 50\%$ de incremento en el diámetro mayor de un nódulo previamente identificado > 1 cm en el eje corto. Lesiones PET positivas si el linfoma con captación FDG o PET positiva previo a la terapia	Incremento de $> 50\%$ desde nadir en el SPD de cualquiera de las lesiones previas	Lesión nueva o recurrente

Abreviaciones: RC, remisión completa; FDG, [18 F]florodeoxyglucosa; PET, tomografía por emisión de positrones; CT, tomografía computada; PR, remisión parcial, remisión parcial; SPD, la suma del producto de los diámetros; SD, enfermedad estable; PD enfermedad progresiva.

Tamaño de muestra:

De acuerdo a la recomendación de Tabachnik y Fidell, los estudios de análisis multivariado pueden proyectarse con un total de 5 a 10 eventos por variable analizada. Si se incluyen 10 variables se requieren 100 eventos de respuesta clínica. Para una estimación de respuestas clínicas del 80% en nuestros pacientes, se requerirían 120 a 130 pacientes.

De acuerdo a la evaluación del rendimiento del modelo final, considerando una probabilidad de alfa 0.05, con una prevalencia de respuestas clínicas del 80 %, considerando un valor de sensibilidad estimado del 90 %, con un límite inferior del intervalo de confianza del 95% para la sensibilidad estimada del 85 % se requieren 180 pacientes (52).

Análisis estadístico

Las variables demográficas se listan en tablas de frecuencias. Las variables numéricas se analizarán por medidas de tendencia central (media) + desviación estándar. Se construyeron curvas de supervivencia global (SG) y libre de enfermedad (SLE) por el método de Kaplan-Meier. Sus diferencias se evaluarán con el método de Logrank. En ambas se consideraron como tiempo basal la fecha del diagnóstico histológico y como fecha para el desenlace la fecha de recaída (para SLE), o bien la de defunción y/o última consulta (para SG). Se realizó análisis de regresión de Cox para evaluar los factores que pudieran influir en la SLE y SG. Se calculó el riesgo relativo como medida de asociación y se calcularon además los intervalos de confianza del 95%.

Para analizar los factores asociados con el evento de respuesta clínica se utilizó el modelo de regresión logística, y se calculó la razón de momios como medida de asociación con sus intervalos de confianza del 95%. Se realizó análisis de interacciones de la manera habitual, y el cálculo del modelo final se realizó el método de "backward stepwise".

Se considerará como estadísticamente significativo a los valores menores de 0.05; todas las estadísticas serán de dos colas y se utilizará el software SPSS versión 20 para Windows.

CONSIDERACIONES ÉTICAS

1. PROCESO DE OBTENCION DE MUESTRAS

Las muestras obtenidas del tejido parafinado y de sangre periférica, fueron obtenidas para fines diagnósticos.

2. PROCESO DE OBTENCIÓN DEL CONSENTIMIENTO INFORMADO

Se informó al paciente y a su familiar sobre el estudio a realizar, proporcionando suficiente tiempo para aclarar cualquier duda que presente durante la explicación del mismo, se les proporcionó un consentimiento informado para que pudieran comentar con otros familiares o médicos sobre su participación voluntaria o su decisión de no participar en el protocolo. Se agendó una cita (al día siguiente o en la siguiente consulta del paciente) para recibir la decisión que hayan tomado sobre su participación. En caso de aceptación, se procedió a firmar un original por el paciente, testigos e investigador principal y se entregará otro documento igual, firmado para que el paciente pueda conservarlo.

RESULTADOS.

Se incluyeron 138 pacientes, las características demográficas y del tumor se resumen en las siguientes tablas:

Tabla número 1: Características generales de la población de estudio.

Características Generales	DNA C*y T** n=138
Masculino	70 (50.7 %)
Femenino	68 (49.3%)
Edad en años, mediana + SD, (rango)	59 años + 14.34 (rango 21-94)
ECOG [†] ≥ 2	40 (28%)
Diabetes Mellitus, n (%)	32 (23.1%)
Hipertensión arterial	34 (24.6%)
Cardiopatía	1 (0.7%)
I	21 (15.21%)
II	21 (15.21%)
III	15 (10.86%)
IV	81 (58.69%)
Bulky	54 (39.13%)
Sitios Extranodales ≥ 2	40 (29%)
Síntomas B	63 (45.7%)
Bajo	38 (28.3%)
Intermedio-Bajo	16 (11.9%)
Intermedio-Alto	24 (17.3%)
Alto	60 (44.7%)

*C: Circulante **T: Tumoral † Clase funcional ** Fracción de eyección del Ventrículo Izquierdo por MUGA, †Índice pronóstico internacional.

Tabla número 2: Características Histológicas, Bioquímicas y Riesgo de entidad neoplásica.

Características	N=138 (%)
Doble HIT	15 (10.86%)
Centro germinal	98 (71.01%)
No Centro germinal	34 (24.6%)
No Clasificable	6 (4.34%)
Ki-67 \geq 70%	63 (45.6%)
Ki-67 \geq 90%	20 (14.4%)
MYC positivo	53 (38.4%)
Alteraciones Bioquímicas	
DHL promedio \pm SD (Rango)	725.92 \pm 1051 (115-9960)
B2 Microglobulina promedio \pm SD (Rango)	3.15 \pm 2.05 (1-17.25)

Tabla 3. Comparación de las mutaciones de *EZH2* en tejido tumoral y ADN circulante.

		ADN Circulante		
		Wild type	Mutaciones	Total
ADN Tumoral	Wild type	116	1	117
	Mutaciones	11	10	21
Total		127	11	138

Se analizaron los casos se determinan verdaderos positivos 10, verdaderos negativos 116, falso positivo 1 caso y falso negativo 10 casos. Se calcula la sensibilidad de esta prueba diagnóstica 47% y la especificidad 99%

Los pacientes con Linfoma difuso de células grandes fueron tratados con Quimioterapia, CHOP-Rituximab, no obstante paciente con FEVI o complicaciones cardiacas recibieron COP-R, al debut con infiltración a sistema nervioso central recibieron dos ciclos de Dosis altas de metotrexate con citarabina y posterior esquema con CHOP- Rituximab, no recibieron tratamiento 6 pacientes debido a sus

condiciones frágiles al ingreso hospitalario. De los 132 pacientes que recibieron quimioterapia, 69 requirieron radioterapia por enfermedad voluminosa al diagnóstico.

Se evaluó también la presencia de complicaciones como mielosupresión dependiente de transfusiones registrada únicamente en 15 pacientes, complicaciones cardiovasculares 2, complicaciones renales 2, gastrointestinales 5, neuropatía 1, trombosis 3 eventos, y complicaciones pulmonares 7 pacientes.

Se determinó la respuesta en base a PET-CT con la escala de Deauville, obteniendo la siguiente tabla

Tabla 4. Frecuencia de Respuestas a tratamiento.

Tipo de Respuesta	n (%)
Completa	82 (59.4)
Parcial	16 (11.5)
Enfermedad Estable	2 (1.44)
Progresión	16 (11.55)
No evaluada	22 (15.9)

Posteriormente, se realizó un análisis bi variado y por ANOVA para evaluar la relación entre la presencia de mutaciones de *EZH2* en el ADN tumoral y recaída

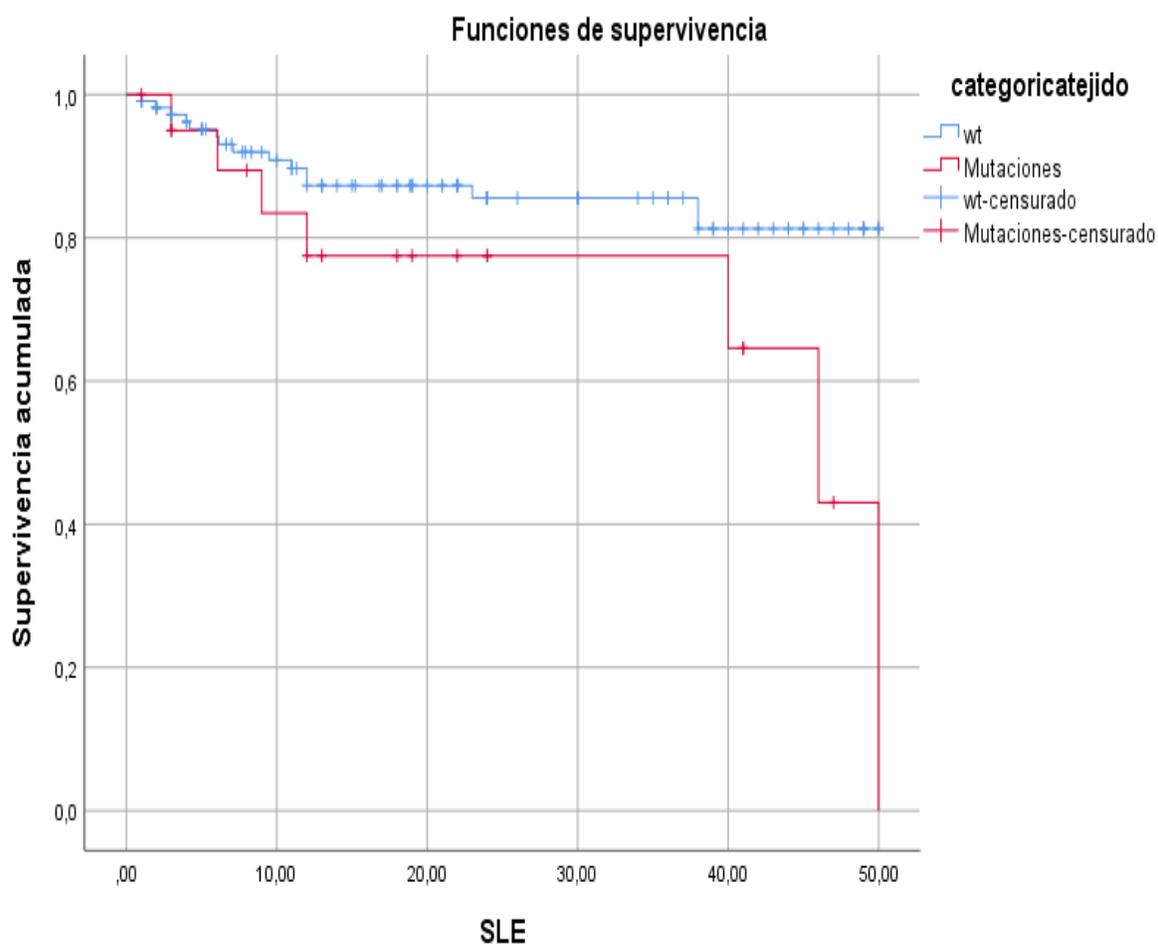
Tabla 5: Relación de mutaciones de *EZH2* en ADN tumoral y circulante con recaída - ANOVA

		Recaída			Valor de p
		No	Si	Total	
ADN tumoral	Wild-type	98	14	122	0.016
	Mutaciones	14	7	21	
		112	21	133	
		Recaída			Valor de p
		No	Si	Total	
ADN circulante	Wild-type	105	17	122	0.051
	Mutaciones	7	4	11	
		112	21	133	

Se realiza el análisis de la Supervivencia Libre de Evento (SLE) en tejido tumoral y sangre periférica así como las gráficas de Supervivencia Global (SG) en tejido

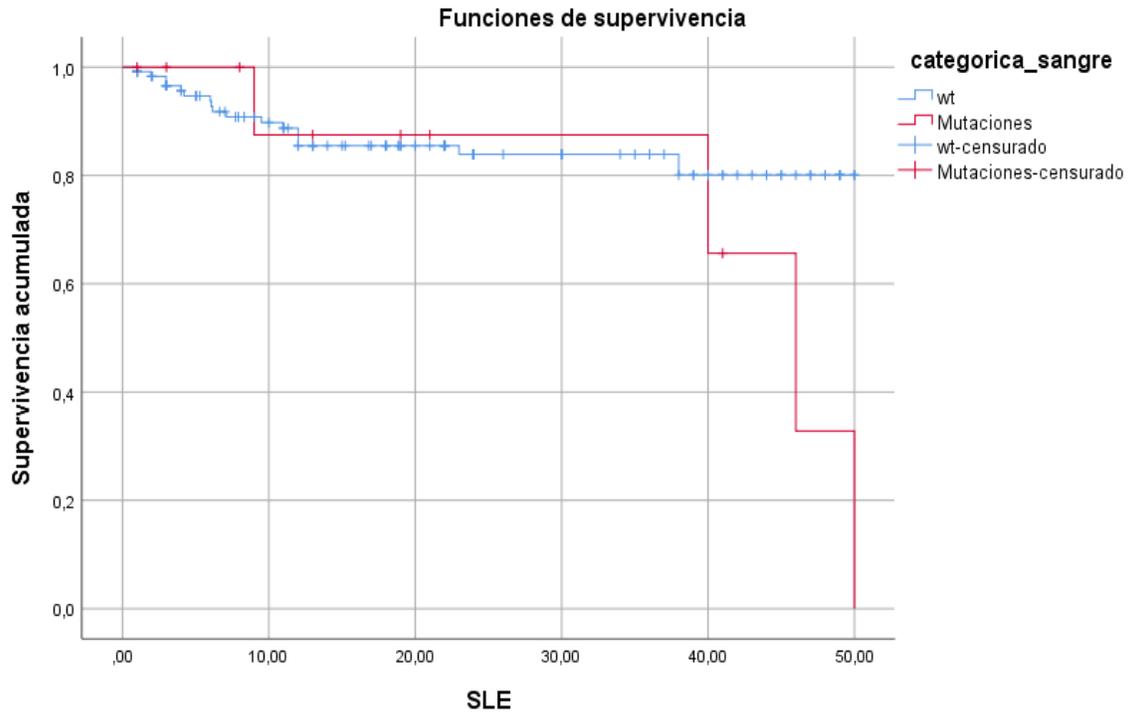
tumoral y sangre periférica con mutación el exón 16 del codón 641 EZH2. Se realizó la gráfica de sensibilidad y especificidad en relación a presencia de ADN tumoral y recaída.

Figura 1: Supervivencia Libre de enfermedad de pacientes con mutación y wild-type en ADN Tejido tumoral.



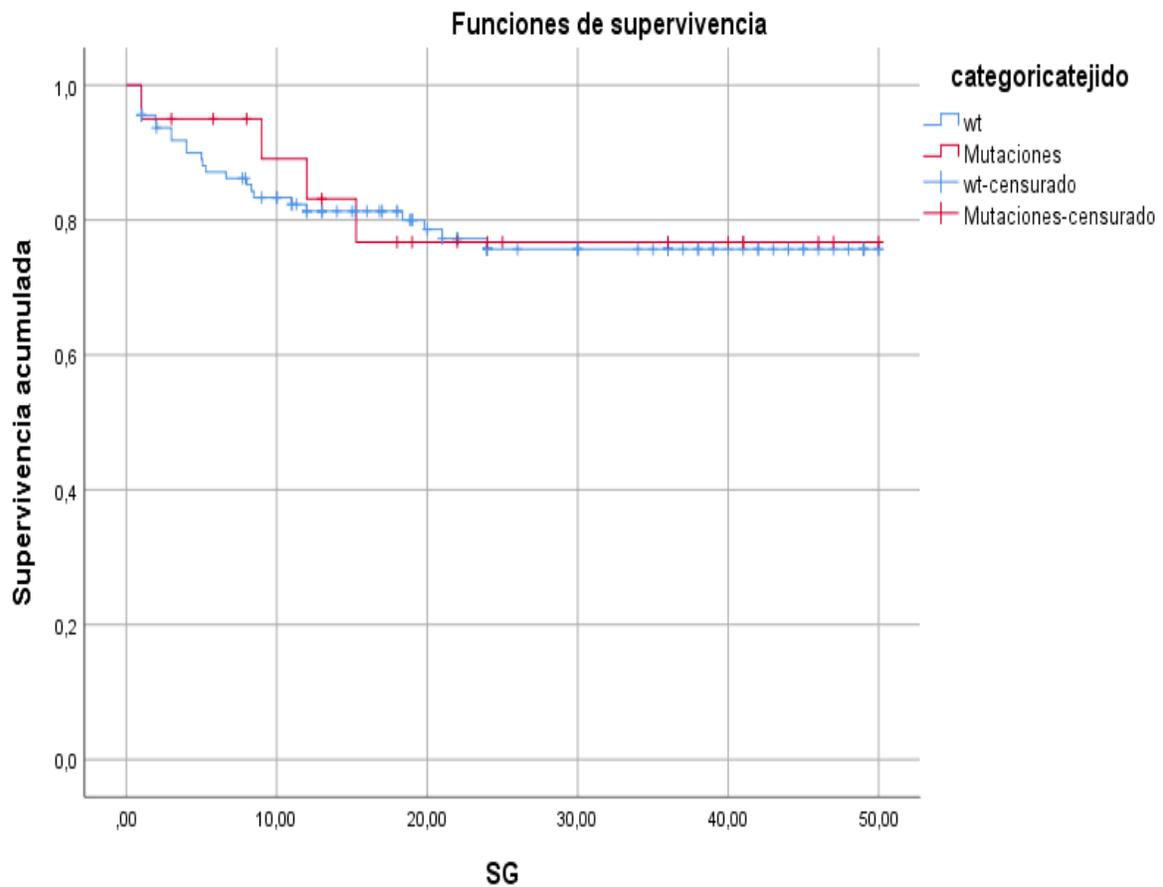
Supervivencia libre de evento en pacientes con LDCGB con mutación en exón 16, codón 641 EZH2 en ADN Tumoral
La mediana en meses de SLE global es de 50 meses y con mutaciones de 46 meses
valor de p 0.58, Log Rank 3.5

Figura 2: Supervivencia Libre de Evento de pacientes con mutación y wild-type en ADN en Sangre periférica.



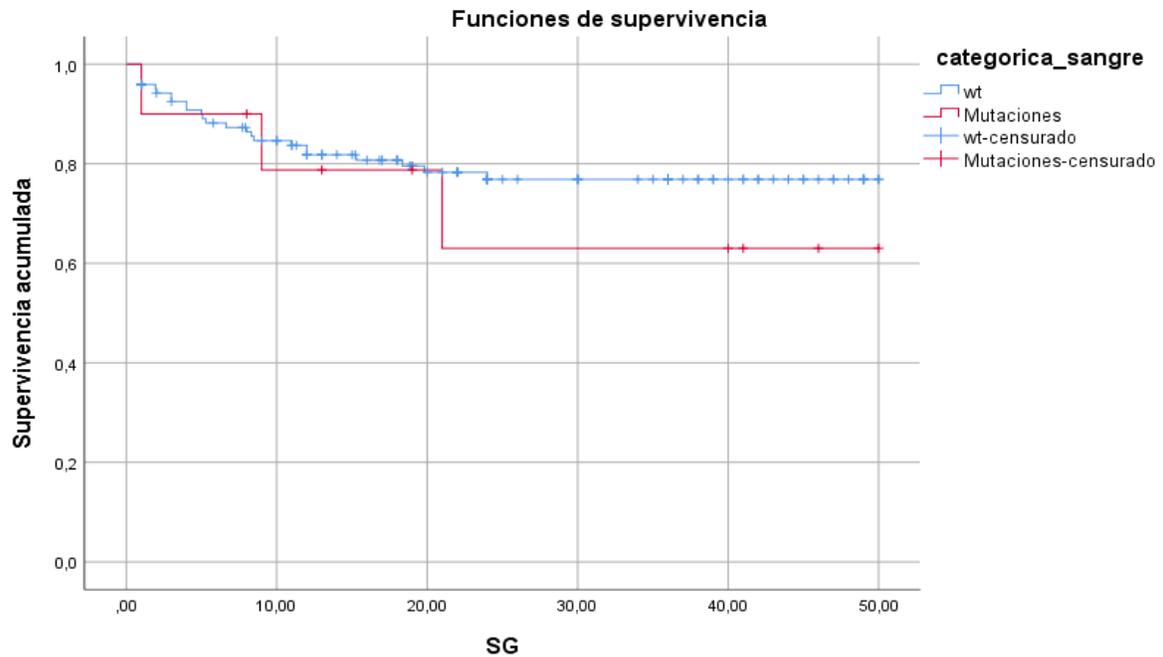
Supervivencia libre de evento con mutación en ADN Circulante.
La mediana de SLE 50 meses, valor de p 0.19

Figura 3: Supervivencia Global de pacientes con mutación y wild-type en ADN Tejido tumoral.



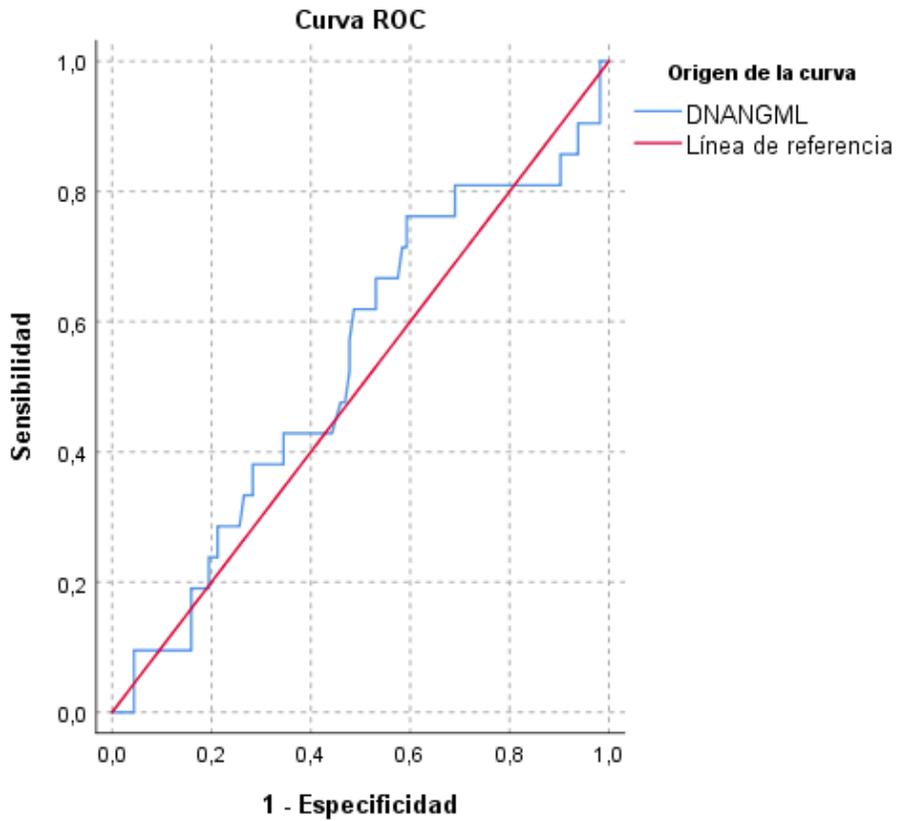
Supervivencia Global de pacientes con LDCGB con mutación en exón 16 codón 641 en ADN del tejido tumoral. La media es de 40 meses, valor de p 0.866

Figura 4: Supervivencia Global de pacientes con mutación y wild-type en ADN circulante en Sangre periférica.



Curva Kaplan Meier- Supervivencia Global en ADN Circulante (sangre periférica), pacientes con LDCG-B con mutación en exón 16 EZH2 codon 641. La media es de 40 meses valor de $p=0.531$.

Figura 5: Sensibilidad y Especificidad de ADN tumoral y Recáida.



Área bajo la curva ROC

Variables de resultado de prueba	Área
DNANGML	0,534

Se realizó el cálculo de sensibilidad de 47% y especificidad de 99%, $p=0,0534$.

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS.

Dentro de las características generales, se registró correlación con los registros internacionales donde el Linfoma Difuso de Células Grandes B es prevalente en el sexo masculino (4) acorde a nuestra población de estudio; y con similar distribución a la población de Estados Unidos de América, donde las dos terceras partes son diagnosticados en mayores de 60 años (3), la población diagnosticada en nuestra institución presento una media de edad de 59 años con rango de 21-94.

La presencia de comorbilidades se ha identificado con menor supervivencia de los pacientes con diagnósticos de neoplasias, en el caso de los pacientes con linfoma no Hodgkin la prevalencia de Diabetes Mellitus en 19.21% e hipertensión arterial en 9.5% sin embargo lo registrado en esta cohorte es mayor a lo documentado en otras series siendo para Diabetes Mellitus e Hipertensión arterial 23.1% y 24.6% respectivamente, podría estar en relación a la dieta y estilos de vida de la población sin embargo se requiere de estudios dirigidos a esta índole para valorar su relación. (5,6)

El índice pronóstico internacional (IPI) empleado al diagnóstico del Linfoma difuso de células grandes B es utilizado para discernir a pacientes con alto riesgo de recaída, se establecen cuatro grupos riesgo bajo, intermedio bajo, intermedio alto y alto riesgo de recaída en base a puntuación obtenida en los criterios clínicos (7) en esta serie 60 pacientes (44.7%) se registraron en este subgrupo con Alto riesgo, 24 (17.3%) riesgo intermedio alto, 16 (11.9%) intermedio bajo y 38 (28.3%) bajo riesgo de recaída.

c-MYC es uno de los factores transcripcionales más esenciales, que regula una amplia gama de funciones celulares, incluida la proliferación, el crecimiento y la apoptosis. La desregulación de *c-MYC* induce linfomagénesis por la pérdida del control estricto de la expresión de *c-MYC*, lo que conduce a la sobreexpresión de la proteína c-MYC intacta, en contraste con las mutaciones somáticas o proteínas de fusión observadas en muchos otros oncogenes (17), se determinó por inmunohistoquímica la presencia de MYC positivo en 53 pacientes (38.4%).

La determinación del origen celular en este tipo de linfomas es determinante en la fisiopatología de esta entidad, 98 pacientes (71.01%) de esta cohorte presentaron origen centro germinal, siendo el más común de los subgrupos moleculares (1).

La elevación del índice de proliferación tumoral Ki-67 se asocia a menor supervivencia global y menor supervivencia libre de progresión, Tang y colaboradores (16) describieron el valor de corte Ki-67 \geq 70% en 180 pacientes (65.7%) así como Ki-67 \geq 90% 58 pacientes (21.2%), en nuestra unidad se registraron 63 pacientes con Ki-67 \geq 70% (45.6%) y Ki-67 \geq 90% 20 pacientes (14.4%) las muestras no son similares debido al tamaño muestral.

En esta era de la medicina personalizada, la información genética es fundamental para el diagnóstico temprano ayudando a la estimación de riesgo, dirigiendo a la opción terapéutica y monitoreando la recaída de la enfermedad, por lo cual es necesario comprender los paisajes genómicos tumorales y la dinámica de la enfermedad. (22)

El ADN circulante, es un biomarcador no invasivo, en tiempo real y específico del tumor que refleja de manera confiable el perfil genético tumoral integral por lo que es muy prometedor en la práctica individualizada, incluido para el diagnóstico y pronóstico preciso, el monitoreo de respuesta y detección de recaída en pacientes con linfomas difusos de células grandes B, (23) se reconoce la necesidad de distinguir la variable silvestre (Wild-type) y la presencia de mutaciones en el EZH2 en exón 16, se encontró que 116 pacientes son verdaderos falsos negativos, 10 verdaderos positivos, 11 falsos negativos y curiosamente un caso con una mutación circulante sin detección, se realizó la cuantificación de ADN circulante con una concentración media de 1575 ng/mL, con rango de 222-170,531 ng/mL, documentándose una mayor concentración de AND circulante al diagnóstico en los pacientes que presentaron recaída, después de la comparación con ANOVA, se encontró correlación estadísticamente significativa con valor de $p = 0,016$ entre la concentración y recaída.

Se identificaron mutaciones del exón 16 en 20 muestras de tumor y 11 muestras de sangre periférica, después de considerar las muestras tumorales como estándar de referencia la sensibilidad de ADN circulante fue de 47% y la especificidad del 99% para diagnosticar mutaciones del EZH2 en el exón 16, estas mutaciones tuvieron un impacto negativo en la supervivencia libre de eventos, tanto en tejido con mediana de 38,3 meses frente 43 meses, con valor de $p = 0,05$ y en ADN circulante con mediana de 35 frente 40 meses con valor de $p = 0,049$ meses.

Se alcanzó la respuesta en 98 pacientes (70.9%) del grupo en estudio y la recaída se registró en 21 pacientes (15.2%), similar a lo reportado en el estudio inicial de evaluación de mutaciones únicamente en ADN tumoral donde ellos lograron respuesta en 151 pacientes (76.3%) y recaídas en 43 pacientes (21.7%), (41), en el estudio del grupo GELA las respuestas completas se obtuvieron en 76% considerando la heterogeneidad de las poblaciones las tasas de respuestas son semejantes.

CONCLUSIONES

1. Dentro de las características generales de los pacientes atendidos en el Instituto Nacional de cancerología con diagnóstico de Linfoma difuso de células grandes B predomina el sexo masculino en 50,7%, ECOG \geq 2 49,3%, Estadio III-IV 69,6%, IPI de alto riesgo 43,5% de la población de estudio
2. El origen centro germinal continua siendo el más frecuente en este linfoma agresivo, con expresión positiva para c-MYC, de la determinación de mutaciones en el codón 641 del exón 16 de *EZH2* se encontró que 116 pacientes son verdaderos falsos negativos, 10 verdaderos positivos, 11 falsos negativos y curiosamente un caso con una mutación circulante sin detección, así mismo se realizó la determinación de la concentración media de ct-ADN 1575 ng / ml (222-170531 ng / ml) con IQ 25-75 (902-754650), la mediana de ambos grupos 2639 ng / ml.
3. La determinación de ct-ADN es un biomarcador que se evaluó como factor de impacto en la recaída tanto en ADN tumoral con valor de p 0,016 como en ct-ADN de sangre periférica con valor de p 0,05, con una sensibilidad de 47% y especificidad de 99%, se analizó la supervivencia libre de evento con mediana de 40 meses con valor de p 0,058; no se ha alcanzado la supervivencia global. El estándar de tratamiento R-CHOP alcanza en este grupo de pacientes respuestas globales en 70.9%, presentándose recaídas en 15.21%.
4. La técnica utilizada para analizar las mutaciones de *EZH2* en ADN circulante fue poco específica y altamente sensible. Es necesario evaluar técnicas más específicas.

REFERENCIAS

1. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. WHO classification of tumors of haematopoietic and lymphoid tissues. 4th ed. Lyon: IARC Press; 2008.
2. American Cancer Society: Cancer Facts and Figures 2012. Atlanta, Ga: American Cancer Society, 2012. Available online.
3. Shankland KR, Armitage JO, Hancock BW: Non-Hodgkin lymphoma. *Lancet* 2012; 380 (9844): 848-57.
4. GLOBOCAN. International Agency for Research on Cancer. WHO. <http://globocan.iarc.fr/factsheets/populations/factsheet.asp?uno=484>
5. Gao, R., Liang, JH, Hombre, TS, Wang, L., Zhu, HY, Wu, W., Fan, L., Li, JY, Yang, T. y Xu, W. (2019). La diabetes mellitus predice una supervivencia inferior en el linfoma difuso de células B grandes: un análisis emparejado por puntuación de propensión. *Investigación y manejo del cáncer* , 11 , 2849–2870. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S185319>)
6. Neeravari VS, Bannigidad DM, Rao L, Association of Hypertension and Diabetes Mellitus with Non-Hodgkin lymphoma- A study 410 cases. *Indian J Pathol Oncol* 2016;3 (4): 696-700
7. Project TIN-HsLPP. A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project. *N Engl J Med* 1993; 329:987-994.
8. Sehn LH, Berry B, Chhanabhai M, et al. 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 RCHOP. *Blood* 2007;109:1857-1861.
9. Advani RH, Chen H, Habermann TM, et al. Comparison of conventional prognostic indices in patients older than 60 years with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP in the US Intergroup Study (ECOG 4494, CALGB 9793): consideration of age greater than 70 years in an elderly prognostic index (E-IPI). *Br J Haemat* 2010; 151:143–15.

10. Tadmor T, Bari A, Sacchi S, et al. Monocyte count at diagnosis is a prognostic parameter in diffuse large B-cell lymphoma: a large multicenter study involving 1191 patients, in the pre and post rituximab era. *Haematologica*. 2013; 98:xxx doi:10.3324/haematol.2013.088161
11. Nogai H, Dörken B, Lenz G. Pathogenesis of Non-Hodgkin's Lymphoma. *J Clin Oncol* 2011; 29:1803-1811.
12. Hans C, Weisenburger D, Greiner T, et al. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood* 2004;103:275-282.
13. Choi WW, Weisenburger DD, Greiner TC et al. A new immunostain algorithm classifies diffuse large B-cell lymphoma into molecular subtypes with high accuracy. *Clin Cancer Res* 2009;15:5494-5502.
14. Gutiérrez-García G, Cardesa-Salzman T, Climent F, 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.
15. Visco C, Li Y, Xu-Monette Y, et al. Comprehensive gene expression profiling and immunohistochemical studies support application of immunophenotypic algorithm for molecular subtype classification in diffuse large B-cell lymphoma: a report from the International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program Study. *Leukemia* 2012; 26, 2103–2113.
16. Tang, YL, Zhou, Y., Cheng, LL, Su, YZ y Wang, CB (2017). El índice BCL2 / Ki-67 predice la supervivencia en el linfoma difuso de células B grandes similar a las células B del centro germinal. *Cartas de oncología* , 14 (3), 3767–3773. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.6577>
17. Perry AM, Mitrovic Z, Chan WC. Biological Prognostic Markers in Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Can Control* 2012; 19(3): 214-226.
18. Velichutina I1, Shaknovich R, Geng H. et. al. EZH2-mediated epigenetic silencing in germinal center B cells contributes to proliferation and lymphomagenesis. *Blood*. 2010 Dec 9;116(24):5247-55.

19. Berg T1, Thoene S2, Yap D3. et. al. A transgenic mouse model demonstrating the oncogenic role of mutations in the polycomb-group gene EZH2 in lymphomagenesis. *Blood*. 2014 Jun 19;123(25):3914-24.
20. Saieg MA1, Geddie WR, Boerner SL, et. al. EZH2 and CD79B mutational status over time in B-cell non-Hodgkin lymphomas detected by high-throughput sequencing using minimal samples. *Cancer Cytopathol*. 2013 Jul;121(7):377-86
21. Ryan RJ1, Nitta M, Borger D. et. al. EZH2 codon 641 mutations are common in BCL2-rearranged germinal center B cell lymphomas. *PLoS One*. 2011;6(12):e28585
22. Wu FT, Lu L, Xu W, Li JY, Circulating tumor DNA: clinical roles in diffuse large B cell lymphoma. *Ann Hematol* 2019. Feb;98(2):255-269. Doi:10.1007/s00277-018-3529-9. Epub 2018 Oct27. PMID:30368587.
23. Diaz LA, Jr Kinzler, KW, Vogelstein B, Papadopolulos N (2011) Reordenamientos del gen IgH como biomarcadores plásmaticos en pacientes con linfoma no Hodgkin. *Oncotarget* 2 (3):178-185, doi:10/18632/oncotarget.235) y (Roschewski M, Dunleavy K, Pittaluga S et al (2015) Monitorización de TC y ADN tumoral circulante en pacientes con linfoma difuso de células grandes B no tratados: un estudio de biomarcadores correlativos. *Lancet Oncol* 16 (5):541-549.
24. Dubois S, Mareschal S, Picquetot JM et al (2015) Perfiles inmunohistoquímica y genómicos de linfomas difusos de células grandes B: ¿implicaciones para la terapia con inhibidores de EZH2 dirigida? *Oncotarget* 6 (18):16712-16724, doi: 10.18632/oncotarget.3154
25. Camus V, Sarafan- Vasseur N, Bohers E et al (2016) PCR digital para la cuantificación de mutaciones somáticas recurrentes y potencialmente accionables en ADN libre circulante en pacientes con linfoma difuso de células grandes B. *Linfoma de Leuk* 57(9):2171-2179, doi: 10.3109/10428194.1139703
26. Chang W. Pathogenesis of diffuse large B cell lymphoma. *Int J Hematol* 2010; 92:219–230.
27. Tam W, Gomez M, Chadburn A, et al: Mutational analysis of PRDM1 indicates a tumor suppressor role in diffuse large B-cell lymphomas. *Blood* 2006;107:4090-4100.

28. Lam LT, Wright G, Davis RE, et al: Cooperative signaling through the signal transducer and activator of transcription 3 and nuclear factor- κ B pathways in subtypes of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2008;111:3701-3713.
29. Fu K, Weisenburger D, Choi W, et al. Addition of Rituximab to Standard Chemotherapy Improves the Survival of Both the Germinal Center B-Cell–Like and Non–Germinal Center B-Cell–Like Subtypes of Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *J Clin Oncol* 2008;26:4587-4594.
30. Nyman H, Jerkeman M, Karjalainen-Lindsberg ML, et al. Prognostic impact of activated B-cell focused classification in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with R-CHOP. *ModPathol* 2009; 22: 1094–1101.
31. Lenz G, Wright G, Dave SS, et al. Stromal gene signatures in large B-cell lymphomas. *N Engl J Med*. 2008;359(22):2313-2323.
32. Iqbal J, Meyer PN, Smith LM, et al. BCL2 predicts survival in germinal center B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma treated with CHOP-like therapy and rituximab. *Clin Cancer Res*. 2011;17(24):7785-7795.
33. Coiffier B, Lepage E, Briere J et al. CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 2002;346:235-242.
34. Feugier P, Van Hoof A, Sebban C, et al. Long-Term Results of the R-CHOP Study in the Treatment of Elderly Patients With Diffuse Large B-Cell Lymphoma: A Study by the Grouped'Etude des Lymphomes de l'Adulte. *J Clin Oncol* 2005; 23:4117-4126.
35. Pfreundschuh M, Trümper L, Kloess M, Schmits R, Feller AC, Rübke C, et al. Two-weekly or 3-weekly CHOP chemotherapy with or without etoposide for the treatment of elderly patients with aggressive lymphomas: results of the NHL-B2 trial of the DSHNHL. *Blood* 2004;104(3):634–41.
36. Pfreundschuh M, Schubert J, Ziepert M et al. Six versus eight cycles of biweekly CHOP-14 with or without rituximab in elderly patients with aggressive CD20+ B-cell lymphomas: a randomized controlled trial (RICOVER-60). *Lancet Oncol* 2008;9:105-116.

37. Cunningham D, Smith P, Mouncey P et al. A phase 3 trial comparing R-CHOP 14 and RCHOP 21 for the treatment of patients with newly diagnosed diffuse large B-cell non-Hodgkin lymphoma (abstract). *J Clin Oncol* 2009;27:(15s). Abstract 8506.
38. Delarue R, Tilly H, Salles G et al. RCHOP14 compared with R-CHOP21 in elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma: results of the interim analysis of the LNH03–6B GELA study (abstract). *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)* 2009;114. Abstract 406.
39. Pfreundschuh M, Trumper L, Osterborg A et al. CHOP-like chemotherapy plus rituximab versus CHOP-like chemotherapy alone in young patients with good-prognosis diffuse large- B-cell lymphoma: a randomized controlled trial by the MabThera International Trial (MInT) Group. *Lancet Oncol* 2006;7:379-391.
40. Pfreundschuh M, Kuhnt E, Trümper L, et al. DSCHOP-like chemotherapy with or without rituximab in young patients with good-prognosis diffuse large-B-cell lymphoma: 6-year results of an open-label randomised study of the MabThera International Trial (MInT) Group. *Lancet Oncology* 2011;12(11):1013–22.
41. Martelli M, Ferreri A, Agostinelli C, et al. Diffuse large B-cell lymphoma. *Crit Rev Oncol/Hematol* 2013
42. Greb A, Bohlius J, Schiefer D, et al. High-dose chemotherapy with autologous stem cell transplantation in the first line treatment of aggressive non Hodgkin lymphoma (NHL) in adults. *Cochrane Database Syst Rev* 2008(1):CD004024.
43. Wilson W, Jung SH, Porcu P, Hurd D, et al. A cancer and leukemia group B multi-center study of DA-EPOCH-rituximab in untreated diffuse large B-cell lymphoma with analysis of outcome by molecular subtype *Haematologica* 2011;96:xxx doi:10.3324/ haematol.2011.056531 [Epub ahead of print]
44. Persky DO, Unger JM, Spier CM et al. Phase 2 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* 2008;26:2258-2263.
45. Blay J, Gomez F, Sebban C, et al. The International Prognostic Index correlates to survival in patients with aggressive lymphoma in relapse: analysis of the PARMA trial. Parma Group. *Blood* 1998;92(10):3562–8.

46. Guglielmi C, Gomez F, Philip T, et al. Time to relapse has prognostic value in patients with aggressive lymphoma enrolled onto the Parma trial. *Journal of Clinical Oncology* 1998;16(10):3264–9.
47. Vellenga E, van Putten WL, van 't Veer MB et al. Rituximab improves the treatment results of DHAP-VIM-DHAP and ASCT in relapsed/progressive aggressive CD20+ NHL: a prospective randomized HOVON trial. *Blood* 2008;111:537-543.
48. Gisselbrecht C, Glass B, Mounier N et al. Salvage regimens with autologous transplantation for relapsed large B-cell lymphoma in the rituximab era. *J ClinOncol* 2010;28:4184-4190.
49. Van Kampen RJ, Canals C, Schouten HC et al. Allogeneic stem-cell transplantation as salvage therapy for patients with diffuse large B-cell non-Hodgkin's lymphoma relapsing after an autologous stem-cell transplantation: an analysis of the European Group for Blood and Marrow Transplantation Registry. *J ClinOncol* 2011;29:1342-1348.
50. Shimoni A, Zwas ST, Oksman Y, et al. Yttrium-90-ibritumomab tiuxetan (Zevalin) combined with high-dose BEAM chemotherapy and autologous stem cell transplantation for chemo-refractory aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Experimental Hematology* 2007;35(4):534–40.
51. Shimoni A, Avivi I, Rowe JM, et al. A randomized study comparing yttrium-90 ibritumomab tiuxetan (Zevalin) and high-dose BEAM chemotherapy versus BEAM alone as the conditioning regimen before autologous stem cell transplantation in patients with aggressive lymphoma. *Cancer* 2012;118(19):4706–14.
52. Gnaoui T, Dupuis J, Belhadj K, et al. Rituximab, gemcitabine and oxaliplatin: an effective salvage regimen for patients with relapsed or refractory B-cell lymphoma not candidates for high-dose therapy. *Annals of Oncology* 2007;18(8):1363–8.
53. Ruan J, Martin P, Furman RR, et al. Bortezomib plus CHOP-rituximab for previously untreated diffuse large B-cell lymphoma and mantle cell lymphoma. *Journal of Clinical Oncology* 2011;29(6):690–7.

54. Czuczman MS, Vose JM, Zinzani PL, et al. Confirmation of the efficacy and safety of lenalidomide oral monotherapy in patients with relapsed or refractory diffuse large-B-cell lymphoma: results of an international study (NHL-003). *Blood (ASH)* 2008;112 [abstract 268].
55. Wiernik PH, Lossos IS, Tuscano JM, et al. Lenalidomide monotherapy in relapsed or refractory aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Journal of Clinical Oncology* 2008;26(30):4952–7.
56. Witzig TE, Reeder CB, LaPlant BR, et al. A phase II trial of the oral mTOR inhibitor everolimus in relapsed aggressive lymphoma. *Leukemia* 2011;25(2):341–7.
57. Min SK, Koh YH, Park Y, et al. Expression of HAT1 and HDAC1–3 in diffuse large B-cell lymphomas, peripheral T-cell lymphomas, and NK/T-cell lymphomas. *Korean Journal of Pathology* 2012;46(2):142–50.
58. Meignan M, Gallamini A, Itti E, Barrington S, Haioun C, Polliack A. Report on the Third International Workshop on interim positron emission tomography in lymphoma held in Menton, France, 26-27 September 2011. *Leuk Lymphoma* 2011; 52:1-6
59. Carley S, Dosman S, Jones SR, Harrison M. Simple nomograms to calculate sample size in diagnostic studies. *Emerg Med J.* 2005; 22:180-181.
60. Gan, L., Yang, Y., Li, Q. *et al.* Regulación epigenética de la progresión del cáncer por EZH2: desde conocimientos biológicos hasta potencial terapéutico. *Biomark Res* 6, 10 (2018). <https://doi.org/10.1186/s40364-018-0122-2>
61. Luis F. Oñate-Ocaña, Mayra Ponce-Martínez, Lucía Taja-Chayeb, Olga Gutiérrez-Hernández, Alejandro Avilés-Salas, David Cantú-de León, Alfonso Dueñas-González, Myrna Candelaria-Hernández, A cohort study of the prognostic impact of exon-16 EZH2 mutations in a Mexican-Mestizo population of patients with Diffuse Large B-Cell lymphoma. Original manuscript submitted to: *Revista de Investigación Clínica. Clinical and Translational investigation.* Fleischhacker M, Schmidt B. Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer a survey. *Biochim Biophys Acta.* 2007;775(1):181-232.)

62. Roschewski M, Dunleavy K, Pittaluga S, et al. Circulating tumour DNA and CT monitoring in patients with untreated diffuse large B-cell lymphoma: a correlative biomarker study. *Lancet Oncol.* 2015;16(5): 541-549.)
63. Roschewski M, Dunleavy K, Wilson WH. Moving beyond rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine and prednisone for diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk. Lymphoma.* 55(11), 2428-2437 (2014).
64. Schwarzenbach H, Nishida N, Calin GA, Pantel K. Clinical relevance of circulating cell-free microRNAs in cancer. *Nature reviews Clinical oncology.* 11(3), 145 (2014).
65. Kallam, A , Adusumalli, J , Fu, K , Armitage, JO . Circulación del ADN tumoral en linfomas: Era de la medicina de precisión . *Adv Cell Gene Ther* . 2020 ; 3 : e81. <https://doi.org/10.1002/acg2.81>

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO.

- **TITULO DEL ESTUDIO**

Determinación de un modelo predictivo de respuesta clínica y de supervivencia basado en factores clínicos, histológicos y epigenéticos en pacientes con linfoma no Hodgkin difuso de células grandes “B” tratados con el esquema CHOP-rituximab en el Instituto Nacional de Cancerología: un estudio de Cohorte

- **I. LA JUSTIFICACION Y EL OBJETIVO DEL ESTUDIO.**

Lo/la invitamos a que participe en un estudio de investigación. Los médicos del Instituto Nacional de Cancerología están interesados en estudiar que factores pueden influir en la respuesta al tratamiento de pacientes con Linfoma Difuso de Células Grandes B. El objetivo de este estudio es determinar cuales son los factores presentes en los pacientes (como otras enfermedades, peso, talla, estudios de laboratorio) y/o en el linfoma que pueden influir en la respuesta al tratamiento que requiere para su linfoma.

- **IIA. LOS TRATAMIENTOS A EMPLEARSE Y SU PROPOSITO, INCLUYENDO LA IDENTIFICACION DE LOS PROCESOS EXPERIMENTALES Y LA POSIBILIDAD DE SER ASIGNADO ALEATORIAMENTE A ELLOS.**

En este estudio, su médico le indicará el tratamiento que requiera. No se administrarán medicamentos en experimentación.

- **IIB. LOS PROCEDIMIENTOS MÉDICOS QUE SE REALIZARÁN AL SUJETO DURANTE EL ESTUDIO, ESPECIALMENTE LOS INVASORES.**

Si usted acepta participar, en este estudio se evaluará en el tejido que ya fue biopsiado algunas proteínas y características propias del tumor. Así mismo, se

revisará su expediente clínico para tomar datos como son: peso, talla, enfermedades concomitantes (adicionales al linfoma, como diabetes mellitus, hipertensión), se revisarán los resultados de laboratorio que se requieren previo al inicio de su tratamiento. Posteriormente, el grupo de investigadores seguiremos su evolución y registraremos la respuesta que haya tenido al tratamiento y se establecerá una correlación entre estas variables y la respuesta que haya presentado.

El material histológico será utilizado exclusivamente para fines de esta investigación. No se realizará procedimiento invasivo alguno para fines de este protocolo.

También se le solicitará la toma de una muestra de sangre, de 5 ml. Esta cantidad es aproximadamente 2 cucharadas.

¿POR QUÉ SE ME SELECCIONÓ?

Se le invita a participar por que usted tiene linfoma difuso de células grandes B, que es el linfoma que estamos estudiando.

¿EN QUÉ CONSISTIRÁ MI PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO?

Si usted acepta participar, nos autoriza a utilizar una fracción del tejido que ya fue biopsiado, para estos estudios y a revisar su expediente clínico. Usted no será sometido a maniobras invasivas, ni tratamientos experimentales.

- **LAS RESPONSABILIDADES DEL SUJETO.**

Al aceptar participar en este estudio, usted autoriza el uso del tejido que se le biopsió. Independientemente de su participación o no en este estudio, le sugerimos acuda a todas las recomendaciones que los médicos de la Institución le indiquen.

- **III. LOS RIESGOS O MOLESTIAS ESPERABLES RAZONABLEMENTE PARA EL SUJETO, O UN FETO/EMBRIÓN.**

Por las características de este protocolo, los riesgos son nulos para un feto/embrión. **La toma de muestra puede producir dolor, o alguna molestia local, como un moretón.**

- **IV. LOS BENEFICIOS ESPERABLES, Y UNA MENCIÓN CATEGÓRICA DE QUE NO SE ESPERAN BENEFICIOS CLÍNICOS PARA EL SUJETO, CUANDO SEA EL CASO.**

Los resultados de este estudio no proporcionarán un beneficio directo para usted, pero permitirán conocer un poco más sobre el comportamiento del linfoma que usted tiene y ello pudiera a futuro beneficiar a otros pacientes.

- **V. LOS TRATAMIENTOS ALTERNATIVOS EXISTENTES Y SUS BENEFICIOS/RIESGOS.**

En este estudio no se administrarán tratamientos experimentales, por lo que usted recibirá el tratamiento que su médico le indique.

Usted y su familia deben hacer todas las preguntas que deseen antes de que usted decida participar en este estudio. Asegúrese de obtener toda la información que necesita antes de tomar la decisión.

- **VI. GASTOS ADICIONALES, COMPENSACIONES Y PAGO POR LESIONES RELACIONADAS CON EL ESTUDIO.**

A usted no se le cobrará ningún costo adicional por la revisión del material de la biopsia o por los estudios que en ella se realizarán. No recibirá ninguna remuneración por su participación, ni pago por indemnizaciones.

- **VII. QUE EL CONSENTIMIENTO IMPLICA PERMITIR EL ACCESO A SU EXPEDIENTE MÉDICO A TERCEROS, CON UNA INDICACIÓN DE LOS MISMOS (QUE DEBERÁ INCLUIR AL COMITÉ). QUE TAL ACCESO SE REALIZARÁ CON RESPETO A SU PRIVACIDAD, Y QUE NO SE PUBLICARÁ SU IDENTIDAD, EN TANTO EN CUANTO LO PERMITA LA LEY.**

La información reunida para el estudio será confidencial. El grupo de investigadores tendrá acceso a su expediente clínico y los resultados serán capturados en una base de datos donde usted no podrá ser identificado.

Podremos publicar los resultados del estudio o presentarlos en reuniones profesionales, pero su nombre no se divulgará, ni se mencionará en ningún informe o publicación. No es posible que terceras personas, amigos, o allegados suyos sepan de su enfermedad y conozcan otras cosas únicas acerca de su edad, sexo o enfermedad que pudieran identificarlo a usted en una publicación.

- **VIII. QUE RECIBIRÁ OPORTUNAMENTE CUALQUIER INFORMACIÓN NUEVA QUE PUDIERA AFECTAR A SU DESEO DE PERMANECER EN EL ESTUDIO.**

Estos resultados serán analizados por el grupo de investigadores, de encontrar alguno que lo afecte directamente, se le informará oportunamente.

- **IX. LAS PERSONAS A CONTACTAR EN CASO DE TENER PREGUNTAS SOBRE EL ESTUDIO, CON SU NOMBRE COMPLETO Y TELÉFONO DE CONTACTO.**

Cualquier pregunta que usted pueda tener acerca de cualquier aspecto del estudio, ahora o en cualquier momento en el futuro. Le alentamos a que obtenga respuestas a todas sus preguntas comunicándose con la Dra. Myrna Gloria Candelaria Hernandez, al 56-28-04-00, extensión 43015, investigadora principal.

Es posible que quiera que un amigo o familiar lea el formulario y hable con el médico del estudio junto con usted. Usted puede también hablar con su médico personal acerca de lo que debe hacer. Hablar de las cosas puede ayudarle a tomar la decisión correcta.

- **X. LAS PERSONAS (Y SUS TELÉFONOS) A CONTACTAR EN CASO DE TENER PREGUNTAS ACERCA DE SUS DERECHOS COMO PARTICIPANTE EN EL ESTUDIO, O EN CASO DE CREER QUE HA SUFRIDO UNA LESIÓN COMO RESULTADO DE SU PARTICIPACIÓN. ESTAS PERSONAS SERÁN MIEMBROS DEL COMITÉ**

Y SU IDENTIDAD SE COMUNICARÁ A LA COMUNIDAD DE INVESTIGADORES PARA QUE PUEDAN TENERLO EN CUENTA A LA HORA DE REDACTAR LOS CONSENTIMIENTOS.

Para información acerca de los derechos de los sujetos de investigación, usted puede comunicarse con el Secretario del Comité de Ética, Dra. María del Carmen Lizeth León Castillo al teléfono 56.28-04-00, extensión 37015.

- **XI. LAS CIRCUNSTANCIAS POR LAS CUALES PODRÍA SUSPENDERSE EL ENSAYO PARA UN SUJETO.**

Aún cuando usted autorice voluntariamente participar en este protocolo, en el momento en que usted lo decidiera, puede avisar al grupo de investigadores y retirar su consentimiento informado, sin que ello afecte sus derechos como paciente del INCa.

- **XII. LA DURACIÓN ESPERADA DE LA PARTICIPACIÓN DE CADA SUJETO.**

Si usted decide participar, se vigilará su respuesta al tratamiento a través del expediente clínico, pero no requerirá acudir a visitas especiales para el protocolo.

- **XIII. EL NÚMERO DE SUJETOS A INCLUIR EN TODO EL ESTUDIO Y EN EL CENTRO DEL INVESTIGADOR.**

Se incluirán aproximadamente 200 pacientes en esta Institución.

- **XIV. UNA MENCIÓN EXPLÍCITA Y BIEN DIFERENCIADA QUE INDIQUE QUE LA PARTICIPACIÓN ES TOTALMENTE VOLUNTARIA Y QUE EL SUJETO PUEDE:**
 - REHUSARSE A PARTICIPAR.
 - RETIRARSE DEL ESTUDIO EN CUALQUIER MOMENTO, SI YA ESTÁ PARTICIPANDO.
 - QUE ANTE ESAS DECISIONES NADIE SE ENOJARÁ CON EL SUJETO, NI SE TOMARÁN REPRESALIAS EN CONTRA DEL SUJETO, NI PERDERÁ DERECHOS QUE TUVIERA ANTES DEL ESTUDIO.

Su participación es completamente voluntaria. Usted puede optar por no participar, y puede retirar su consentimiento en cualquier momento. Es decir, si una vez que haya aceptado participar, decide que no se revise su expediente y/o no se realicen los estudios en la biopsia ya tomada, éstos no se realizarán. Su decisión acerca de la participación no afectará a la atención que recibe en el hospital, ahora o en el futuro. Sin embargo, aún si usted se retira del estudio, los médicos del estudio agradecerían poder examinar sus registros médicos en el futuro para ver cómo le ha ido a usted, pero usted puede también negarse a que se haga ésto. Si usted cambia de parecer, se le atenderá igual que a cualquier paciente.

Le agradecemos su consideración. Si está dispuesto(a) a participar en esta investigación, por favor, firme a continuación.

Autorización:

Yo, _____, he leído todo lo antes mencionado, se me han contestado mis preguntas y, por voluntad propia, doy mi consentimiento a participar en este estudio de investigación, en el entendido de que el mismo incluye un examen por el personal de investigación de mis registros médicos para anotar mi diagnóstico definitivo y resultado del tratamiento. Este consentimiento seguirá en vigor hasta la recopilación completa de los datos del estudio, a menos que yo retire mi consentimiento. Mi firma a continuación indica que he recibido una copia de este formulario de consentimiento.

Nombre y (Firma del Participante)

(Fecha)

Dirección

Teléfono

INVESTIGADOR:

Nombre y firma de la persona que obtiene el consentimiento (Fecha)

TESTIGOS

Nombre y (Firma del testigo 1) (Fecha)

Dirección Teléfono

Nombre y (Firma del testigo 2) (Fecha)

Dirección Teléfono