



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN
DE *CD10*, *MUM1*, *BCL-6* Y *BCL-2* EN CÉLULAS
TUMORALES CIRCULANTES PARA LA
CLASIFICACIÓN MOLECULAR DEL LINFOMA DIFUSO
DE CÉLULAS B GRANDES DE ACUERDO AL
ALGORITMO DE HANS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADA EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA

P R E S E N T A:

LEÓN LARA MIRIAM AREMI

ASESORA DE TESIS:

DRA. IRMA OLARTE CARRILLO

CO-ASESORA DE TESIS:

M. EN C. GLORIA LETICIA ARELLANO MARTÍNEZ



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN**

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Titulación
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la: **Tesis**

Determinación de los niveles de expresión de CD10, MUM1, BCL-6 Y BCL-2 en células tumorales circulantes para la clasificación molecular del linfoma difuso de células B grandes de acuerdo al algoritmo de Hans

Que presenta la pasante: **Miriam Aremi León Lara**

Con número de cuenta: **312057659** para obtener el Título de: **Licenciada en Bioquímica Diagnóstica**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 26 de abril de 2021.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M. en C. Idalia Carmen Avila Miyazawa	
VOCAL	M. en C. Gloria Leticia Arellano Martínez	_____
SECRETARIO	M.V.Z. Angel Germán Martínez Sosa	_____
1er. SUPLENTE	M. en C. Beatriz Lucía González Maldonado	_____
2do. SUPLENTE	Dra. Maritere Domínguez Rojas	_____

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional.

LMCF/javg



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Titulación
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la: **Tesis**

Determinación de los niveles de expresión de CD10, MUM1, BCL-6 Y BCL-2 en células tumorales circulantes para la clasificación molecular del linfoma difuso de células B grandes de acuerdo al algoritmo de Hans

Que presenta la pasante: **Miriam Aremi León Lara**

Con número de cuenta: **312057659** para obtener el Título de: **Licenciada en Bioquímica Diagnóstica**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 26 de abril de 2021.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M. en C. Idalia Carmen Avila Miyazawa	
VOCAL	M. en C. Gloria Leticia Arellano Martínez	
SECRETARIO	M.V.Z. Angel Germán Martínez Sosa	
1er. SUPLENTE	M. en C. Beatriz Lucía González Maldonado	
2do. SUPLENTE	Dra. Maritere Domínguez Rojas	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional.

LMCF/javg



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Titulación
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la: **Tesis**

Determinación de los niveles de expresión de CD10, MUM1, BCL-6 Y BCL-2 en células tumorales circulantes para la clasificación molecular del linfoma difuso de células B grandes de acuerdo al algoritmo de Hans

Que presenta la pasante: **Miriam Aremi León Lara**

Con número de cuenta: **312057659** para obtener el Título de: **Licenciada en Bioquímica Diagnóstica**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 26 de abril de 2021.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M. en C. Idalia Carmen Avila Miyazawa	_____
VOCAL	M. en C. Gloria Leticia Arellano Martinez	_____
SECRETARIO	M.V.Z. Angel Germán Martínez Sosa	<i>Angel Germán Martínez Sosa</i>
1er. SUPLENTE	M. en C. Beatriz Lucía González Maldonado	_____
2do. SUPLENTE	Dra. Maritere Domínguez Rojas	_____

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional.

LMCF/javg



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN**

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Titulación
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la: **Tesis**

Determinación de los niveles de expresión de CD10, MUM1, BCL-6 Y BCL-2 en células tumorales circulantes para la clasificación molecular del linfoma difuso de células B grandes de acuerdo al algoritmo de Hans

Que presenta la pasante: **Miriam Aremi León Lara**

Con número de cuenta: **312057659** para obtener el Título de: **Licenciada en Bioquímica Diagnóstica**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 26 de abril de 2021.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M, en C. Idalia Carmen Avila Miyazawa	_____
VOCAL	M. en C. Gloria Leticia Arellano Martínez	_____
SECRETARIO	M.V.Z. Angel Germán Martínez Sosa	_____
1er. SUPLENTE	M. en C. Beatriz Lucía González Maldonado	_____
2do. SUPLENTE	Dra. Maritere Domínguez Rojas	_____

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional.

LMCF/javg



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN**

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Titulación
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la: **Tesis**

Determinación de los niveles de expresión de CD10, MUM1, BCL-6 Y BCL-2 en células tumorales circulantes para la clasificación molecular del linfoma difuso de células B grandes de acuerdo al algoritmo de Hans

Que presenta la pasante: **Miriam Aremi León Lara**

Con número de cuenta: **312057659** para obtener el Título de: **Licenciada en Bioquímica Diagnóstica**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 26 de abril de 2021.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M, en C. Idalia Carmen Avila Miyazawa	_____
VOCAL	M. en C. Gloria Leticia Arellano Martínez	_____
SECRETARIO	M.V.Z. Angel Germán Martínez Sosa	_____
1er. SUPLENTE	M. en C. Beatriz Lucía González Maldonado	_____
2do. SUPLENTE	Dra. Maritere Domínguez Rojas	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional.

LMCF/javg

DEDICATORIAS

A mi abuelo

Por todo lo que hiciste para que yo pudiera llegar hasta aquí

A mi abuelita, mamá y hermano

Por ser mi inspiración y soporte más grande

A Eduardo

Por todo tu apoyo y amor

A los pacientes que participaron en este proyecto, porque todo el trabajo que hacemos como profesionales de la salud es por ustedes.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por darme el regalo de la vida y guiarme en cada paso.

A la Universidad, por darme un lugar en sus filas donde no sólo pude desarrollarme académicamente, sino donde pude conocer personas increíbles que se llegaron a ocupar una parte enorme de mi corazón. Todos los momentos que viví ahí hicieron que fuera la mejor etapa de mi vida.

A mi familia, por apoyar cada una de las decisiones que he tomado y que me trajeron hasta aquí. A mi abuelo, porque nada de esto hubiera sido posible sin ti y no hay momento en que no desee que sigieras aquí. A mi abuelita, por ser mi guía y mi confidente. Por todas las noches en vela que compartiste conmigo y por tus consejos. A mi mamá, por ser un ejemplo de esfuerzo y dedicación. Por siempre hacerme sentir capaz de todo lo que deseara lograr y enseñarme a trabajar para alcanzarlo. A mi hermano, porque espero ser un buen ejemplo para ti y poder enseñarte muchas cosas, así como tú me has enseñado a seguir disfrutando de la vida como una niña. A mis tíos y primos, por siempre creer en mí y recordarme que no todo es estudio. No hay palabras que alcancen a describir todo mi agradecimiento por todos ustedes.

A Eduardo, por todos los mágicos momentos que hemos compartido estos años. Porque siempre has estado ahí para apoyarme, aconsejarme y darme un abrazo siempre que lo necesite. Por todas las risas y las pláticas profundas. Porque nos hemos visto crecer y hemos estado juntos en cada paso de este camino, que espero poder seguir caminando a tu lado.

A todo el personal del laboratorio de Biología Molecular del HGM, por la dedicación, la paciencia y la pasión que pusieron en cada momento para que yo pudiera realizar esta tesis. A la doctora Irma, usted es la persona más admirable que conozco y le agradezco infinitamente haberme guiado por este camino. Al doctor Adolfo, por la confianza que depositó en mí y por todas las palabras de apoyo. A Rafa, Anel, Adrián e Iveth, por todas las enseñanzas académicas y de vida que me dieron. A Jorge, por ser el mejor compañero de tesis, confidente y amigo que hubiera podido pedir.

A mi mejor amiga Frida. Gracias porque me entiendes como nadie más lo hace en el mundo y sé que siempre puedo contar contigo. Has estado en las buenas y en las malas conmigo, y no tengo dudas de que nuestra amistad durará toda la vida.

Y finalmente, a mis amigos Gisela, Dulce, David, Moisés, Ale e Isa por todos los buenos momentos que compartimos que me acompañarán el resto de mi vida.

Este trabajo fue apoyado por la Dirección de Investigación del Hospital General de México con los números de registro DI/19/103/03/006 y DIC/08/204/04/017.

ÍNDICE

ÍNDICE	I
ÍNDICE DE FIGURAS	III
ÍNDICE DE TABLAS	IV
ÍNDICE DE GRÁFICOS	V
ABREVIATURAS	VI
GLOSARIO	VII
1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT	2
3. MARCO TEÓRICO	3
3.1 Linfoma Difuso de Células B Grandes	3
3.1.1 Epidemiología	4
3.1.2 Etiología	4
3.1.3 Clasificación	5
3.1.4 Características clínicas	7
3.1.5 Diagnóstico	9
3.1.6 Factores pronósticos	11
3.1.7 Tratamiento	17
3.2 Células Tumorales Circulantes	19
3.2.1 Enriquecimiento y detección de CTCs	20
4. JUSTIFICACIÓN	23
5. HIPÓTESIS	24
6. OBJETIVOS	25
6.1 Objetivo General	25
6.2 Objetivos Particulares	25
7. DISEÑO EXPERIMENTAL	26
7.1 Población de estudio	26
7.1.1 Criterios de inclusión	26
7.1.2 Criterios de exclusión	26
7.1.3 Criterios de eliminación	26
7.2 Variables de estudio	26
7.2.1 Variables independientes	26
7.2.2 Variables dependientes	26

7.3. Tamaño de la muestra.....	28
7.4.1 Material biológico.....	28
7.4.2 Enriquecimiento de CTCs.....	28
7.4.3 Extracción de RNA.....	28
7.4.4 Síntesis de cDNA.....	29
7.4.5 RT-PCR en punto final.....	29
7.4.6 RT-qPCR.....	30
8. RESULTADOS	32
8.1 Características clínico-patológicas de la población.....	32
8.2 Determinación de la integridad del material genético extraído de sangre periférica de individuos sanos y pacientes con LDCBG	36
8.3 Estandarización de las condiciones de amplificación para RT-qPCR	37
8.4 Expresión de los genes en tumor primario y sangre periférica.....	39
8.5 Expresión de los genes <i>BCL2</i> , <i>CD10</i> , <i>BCL6</i> y <i>MUM1</i> en individuos sanos y en CTCs de pacientes con LDCBG	39
8.5.1 Expresión de <i>BCL2</i> en individuos sanos y en CTCs de pacientes con LDCBG	39
8.5.2 Expresión de <i>CD10</i> en individuos sanos y en CTCs de pacientes con LDCBG	41
8.5.3 Expresión de <i>BCL6</i> en individuos sanos y en CTCs de pacientes con LDCBG	42
8.5.4 Expresión de <i>MUM1</i> en individuos sanos y en CTCs de pacientes con LDCBG	44
8.6 Subclasificación molecular del LDCBG de acuerdo con los resultados obtenidos por RT-qPCR.....	45
8.7 Correlación de la sobreexpresión de los genes y características clínico-patológicas de pacientes con LDCBG	46
9. DISCUSIÓN.....	48
10. CONCLUSIONES	54
11. REFERENCIAS	55
12. ANEXOS.....	68

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Morfología del LDCBG.	3
Figura 2. Diferenciación de la célula B y linfomagénesis.	5
Figura 3. Crecimiento ganglionar cervical en LNH.	7
Figura 4. Clasificación de Ann Arbor modificada por Cotswold	8
Figura 5. Descubrimiento de subtipos de LDCBG mediante perfiles de expresión génica.	13
Figura 6. Predictores de supervivencia de expresión genética en pacientes con LDCBG tratados con R-CHOP.	14
Figura 7. Algoritmo de Hans.	14
Figura 8. Técnicas de detección de CTCs.	21
Figura 9. CTCs detectadas en pacientes con cáncer de pulmón mediante CellSearch Epithelial Cell Kit.	22
Figura 10. Electroforesis de RNA de muestras de individuos sanos y pacientes.	36
Figura 11. RT-qPCR del gen constitutivo <i>GUSB</i> en muestras de individuos sanos y pacientes.	37
Figura 12. Amplificación de genes en líneas celulares.	37
Figura 13. Plots de amplificación de los genes en líneas celulares.	38
Figura 14. Plot de amplificación de <i>BCL2</i> en tumor primario y sangre periférica de un paciente con LDCBG subtipo CBA.	39

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación del linfoma difuso de células B grandes.....	6
Tabla 2. Clasificación de Ann-Arbor modificada por Cotswold.	8
Tabla 3. Escala Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG).....	10
Tabla 4. Grupos de riesgo según el Índice Pronóstico Internacional Revisado (R-IPi).	12
Tabla 5. Esquema de tratamiento R-CHOP en el Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga”.....	18
Tabla 6. Variables de estudio.....	27
Tabla 7. Primers utilizados para la reacción de amplificación mediante RT-PCR.....	30
Tabla 8. Secuencias de primers y sondas para amplificación mediante RT-qPCR.....	31
Tabla 9. Características clínico-patológicas de 30 pacientes con LDCBG.....	34
Tabla 10. Número de muestras de acuerdo con el ciclo de quimioterapia.....	36
Tabla 11. Expresión de <i>BCL2</i> en CTCs de pacientes de acuerdo con el ciclo de quimioterapia.	41
Tabla 12. Expresión de <i>CD10</i> en CTCs de pacientes de acuerdo con el ciclo de quimioterapia.	42
Tabla 13. Expresión de <i>BCL6</i> en CTCs de pacientes de acuerdo con el ciclo de quimioterapia.	43
Tabla 14. Expresión de <i>MUM1</i> en CTCs de pacientes de acuerdo con el ciclo de quimioterapia.	45
Tabla 15. Comparación del subtipo molecular obtenido por inmunohistoquímica (IHQ) y por RT-qPCR utilizando el Algoritmo de Hans	45
Tabla 16. Comparación de la frecuencia de los subtipos CG y CBA por métodos moleculares e inmunohistoquímicos	46
Tabla 17. Correlación entre el subtipo molecular determinado por la sobreexpresión de los genes <i>BCL2</i> , <i>CD10</i> , <i>BCL6</i> y <i>MUM1</i> y los parámetros clínico-patológicos	47

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Características generales de la población.....	32
Gráfico 2. Lactato deshidrogenasa (LDH) (U/L) en pacientes con LDCBG.....	33
Gráfico 3. Origen histológico según inmunohistoquímica de pacientes con LDCBG.	33
Gráfico 4. R-IPI en pacientes con LDCBG.	34
Gráfico 5. Comparación de los niveles de expresión de <i>BCL2</i> en individuos sanos y en CTCs de pacientes con LDCBG.....	40
Gráfico 6. Niveles de expresión relativa de <i>BCL2</i> en CTCs de pacientes por muestra.....	40
Gráfico 7. Comparación de los niveles de expresión de <i>CD10</i> en individuos sanos y en CTCs de pacientes con LDCBG.....	41
Gráfico 8. Comparación de los niveles de expresión en individuos sanos y en CTCs de pacientes con LDCBG.....	42
Gráfico 9. Niveles de expresión relativa de <i>BCL6</i> en CTCs de pacientes por muestra.....	43
Gráfico 10. Comparación de los niveles de expresión de <i>MUM1</i> en individuos sanos y en CTCs de pacientes con LDCBG.....	44
Gráfico 11. Niveles de expresión relativa de <i>MUM1</i> en CTCs de pacientes por muestra.	44

ABREVIATURAS

<i>BCL</i>	<i>B-Cell Lymphoma</i> , Linfoma de células B
CBA	Célula B Activada
<i>CD10</i>	<i>Cluster of Differentiation 10</i> , Antígeno de diferenciación 10
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico Complementario
CG	Centro Germinal
COO	<i>Cell of Origin</i> , Célula de Origen
CTCs	Células Tumorales Circulantes
ECOG	<i>Eastern Cooperative Oncology Group</i>
FFPE	<i>Formalin-Fixed Paraffin-Embedded</i> , Fijado en formalina embebido en parafina
GEP	<i>Gene Expression Profiling</i> , Perfil de expresión génica
<i>GUSB</i>	<i>Glucuronidase Beta</i> , Beta-glucuronidasa
IPI	Índice Pronóstico Internacional
LDCBG	Linfoma Difuso de Células B Grandes
LDH	Lactato deshidrogenasa
LNH	Linfoma No Hodgkin
<i>MUM1</i>	<i>Multiple myeloma oncogene 1</i> , oncogén del mieloma múltiple 1
NF- κ B	<i>Nuclear Factor κ B</i> , Factor Nuclear κ B
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i> , Buffer fosfato salino
PET	Tomografía de Emisión de Positrones
R-CHOP	Rituximab Ciclofosfamida Doxorrubicina Vincristina Prednisona
R-IPI	Índice Pronóstico Internacional Revisado
RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Reversa
RT-qPCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa con Transcriptasa Reversa en Tiempo Real
SG	Sobrevida Global
SLE	Sobrevida Libre de Eventos
β -2-M	β -2-microglobulina

GLOSARIO

Algoritmo: Serie de pasos organizados que describe el proceso que se debe seguir para dar solución a un problema específico.

Algoritmo de Hans: Serie de pasos organizados que, de acuerdo con la interpretación de la expresión inmunohistoquímica de tres antígenos de superficie (CD10, BCL6 y MUM1), puede determinar si el origen histológico del LDCBG corresponde con el fenotipo centrogerminal o con célula B activada.

Apoptosis: Vía de muerte celular programada, con el fin de controlar su desarrollo y crecimiento, que está desencadenada por señales celulares controladas genéticamente.

BCL2: Gen de Linfoma de células B 2 (*B-Cell Lymphoma 2*). Protooncogén que bloquea una vía común de apoptosis, impidiendo que el DNA dañado actúe como una señal de activación de muerte celular programada.

BCL6: Gen de Linfoma de células B 6 (*B-Cell Lymphoma 6*). Represor de transcripción necesario para las células B maduras durante la reacción en el centro germinal, expresándose exclusivamente en esta fase de diferenciación.

Biopsia líquida: Muestra biológica no sólida en la que se pueden encontrar elementos liberados por el tumor primario o su metástasis, tales como células tumorales circulantes (CTCs), DNA libre de células plasmáticas (cfDNA), DNA tumoral circulante (ctDNA) y exosomas.

CD10: Antígeno de diferenciación 10 (*Cluster of differentiation 10*, CD10). Metaloendoproteasa común dependiente de zinc que inactiva varios péptidos de señalización.

Enfermedad mínima residual: Presencia de enfermedad maligna hematológica en pacientes que se encuentran en remisión según análisis convencionales.

Linfoma: Término general que se usa para describir un grupo de cánceres que se originan en el sistema linfático.

MUM1: Oncogén de mieloma múltiple 1 (*Multiple myeloma oncogene 1*). Mediador crítico del desarrollo de células linfoides, mieloides y dendríticas.

Perfil de expresión génica: Medida de la actividad de miles de genes simultáneamente, para crear una imagen global de la función celular.

Tumor primario: Tumoración inicial que se forma en el cuerpo como consecuencia de la multiplicación incontrolada de las células en un proceso neoplásico.

1. RESUMEN

El Linfoma Difuso de Células B Grandes (LDCBG) es una neoplasia linfoide B agresiva que se caracteriza por tener una alta heterogeneidad en la evolución clínica y en la respuesta al tratamiento, por lo cual se han determinado distintos factores de utilidad pronóstica que permiten conocer, agrupar y predecir el comportamiento en la forma más homogénea posible. Entre los factores pronósticos de mayor utilidad se encuentra la detección inmunohistoquímica de biomarcadores como *BCL2*, *CD10*, *BCL6* y *MUM1* para la subclasificación de acuerdo con la célula de origen (Centro Germinal o Célula B Activada) mediante el algoritmo de Hans. Sin embargo, esta metodología requiere de una biopsia del tumor primario como muestra biológica por estudiar, resultando una técnica invasiva para el paciente. En los últimos años se han propuesto alternativas no invasivas para la determinación de estos factores pronósticos como la detección de marcadores moleculares en Células Tumorales Circulantes (CTCs), las cuales son células cancerosas que se han diseminado a la circulación a partir de tumores primarios.

Por lo anterior, en el presente trabajo se determinaron los niveles de expresión de los genes *BCL2*, *CD10*, *BCL6* y *MUM1* en CTCs obtenidas a partir de sangre periférica de pacientes con LDCBG mediante RT-qPCR con el objetivo de realizar la subclasificación en Centro Germinal o Célula B Activada, de acuerdo con el algoritmo de Hans.

Se analizaron 30 pacientes con LDCBG en distintos ciclos de quimioterapia R-CHOP y 30 individuos sanos, encontrándose sobreexpresión de *BCL2* en el 20% (6/30) de los pacientes analizados. Los niveles de expresión de los genes *CD10*, *BCL6* y *MUM1* fueron utilizados para determinar el subtipo molecular de acuerdo con el algoritmo de Hans, pudiendo clasificar 25 de los 30 pacientes analizados. En estos pacientes, se encontró que el 56% (14/25) pertenecían al subtipo CG y 44% (11/25) al subtipo CBA. Además, se compararon los resultados obtenidos con los reportados por el Departamento de Patología del Hospital General de México, encontrando que el 56% (14/25) de los resultados coincidieron entre ambas técnicas. Asimismo, fue posible determinar el subtipo molecular mediante RT-qPCR de aquellos pacientes que no contaban con estudios inmunohistoquímicos suficientes para su clasificación (2/25).

Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que la determinación de los niveles de expresión de genes en CTCs de LDCBG es una herramienta útil para la subclasificación y el seguimiento a partir del diagnóstico y durante el tratamiento; así como para la determinación de factores pronósticos.

2. ABSTRACT

Diffuse Large B-Cell Lymphoma (DLBCL) is an aggressive B-lymphoid neoplasm characterized by having a high heterogeneity in the clinical course and response to treatment, for which different prognostic factors have been determined that allow us to know, group and predict behavior in the most homogeneous way possible. Among the most useful prognostic factors is the immunohistochemical detection of biomarkers such as *BCL2*, *CD10*, *BCL6* and *MUM1* for subclassification according to the cell of origin (Germinal Center or Activated B Cell) using the Hans Algorithm. However, this methodology requires a biopsy of the primary tumor as a biological sample, resulting in an invasive technique for the patient. In recent years, non-invasive alternatives have been proposed for the determination of these prognostic factors, such as the detection of molecular markers in Circulating Tumor Cells (CTCs), which are cancer cells that have spread to the circulation from primary tumors.

This is why in the present work, the expression levels of the *BCL2*, *CD10*, *BCL6* and *MUM1* genes were determined in CTCs obtained from peripheral blood of patients with DLBCL by means of RT-qPCR with the aim of performing the subclassification in Germinal Center or Cell B Activated, according to Hans Algorithm.

30 healthy individuals and 30 patients with DLBCL were analyzed in different cycles of R-CHOP chemotherapy, and *BCL2* overexpression was found in 20% (6/30) of the patients analyzed. The expression levels of the *CD10*, *BCL6* and *MUM1* genes were used to determine the molecular subtype according to the Hans Algorithm, being able to classify 25 of the 30 patients analyzed. In these, it was found that 56% (14/25) belonged to the CG subtype and 44% (11/25) to the CBA subtype. In addition, the results obtained were compared with those reported by the Department of Pathology of the General Hospital of Mexico, finding that 56% (14/25) of the results coincided between both techniques. Likewise, it was possible to determine the molecular subtype using RT-qPCR of those patients who did not have sufficient immunohistochemical studies for their classification (2/25).

The results obtained in this study suggest that the determination of gene expression levels in CTCs of DLBCL is a useful tool for subclassification and follow-up from diagnosis and during treatment; as well as for the determination of prognostic factors.

3. MARCO TEÓRICO

El cáncer se define como un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo. La principal característica del cáncer es la multiplicación rápida de células anormales que se extienden más allá de sus límites habituales y que pueden invadir partes adyacentes del cuerpo o propagarse a otros órganos. El cáncer es la principal causa de muerte en todo el mundo, siendo uno de los mayores retos en salud pública (OMS, 2018).

Entre los distintos tipos de cáncer, las neoplasias hematológicas tienen gran importancia debido al incremento observado en morbilidad y mortalidad generales durante las últimas décadas. Éstas forman un grupo de enfermedades que provienen de la expansión clonal de células hematopoyéticas, determinando el estado de diferenciación de la transformación celular y el fenotipo de la enfermedad (SEGG, 2006). Dentro de las neoplasias hematológicas se encuentran los linfomas no Hodgkin (LNH), que se originan en el tejido linfático. A nivel mundial, los LNH se encuentran en 9º y 11º lugar en hombres y mujeres, respectivamente (Tirado & Mohar, 2007).

3.1 Linfoma Difuso de Células B Grandes

El linfoma difuso de células B grandes (LDCBG) se caracteriza por ser un tipo de neoplasia de células B maduras de mediano o gran tamaño con un patrón de crecimiento difuso (Figura 1). Diferentes estudios han subdividido al LDCBG en diferentes variedades morfológicas y subtipos moleculares, que hacen que se considere como una neoplasia de comportamiento heterogéneo (Swedlow *et al.*, 2017).

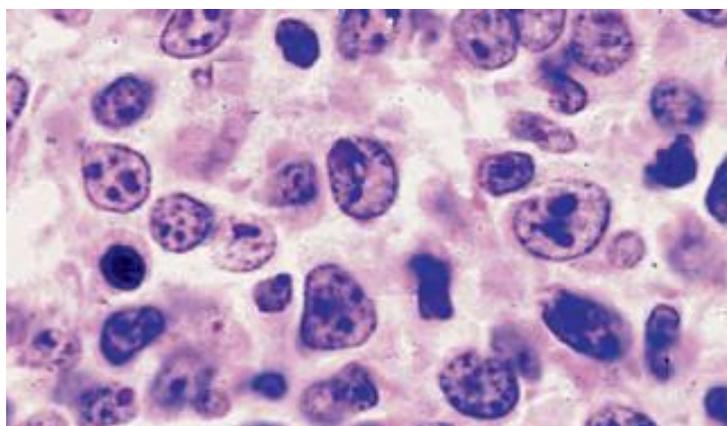


Figura 1. Morfología del LDCBG.

La tinción Hematoxilina & Eosina (400X) de un ganglio linfático muestra un patrón de crecimiento difuso compuesto por linfocitos B grandes con citoplasma moderadamente abundante. Algunas células muestran núcleos multilobulados (Tomada de Swedlow *et al.*, 2017).

3.1.1 Epidemiología

El LDCBG es la neoplasia linfoide más frecuente en adultos, representando el 57% de los casos de linfoma no Hodgkin (LNH) en países occidentales. Aunque la edad promedio de los pacientes al diagnóstico es de 70 años, el espectro de edad es muy amplio y también se presenta en la infancia y en el adulto joven. Afecta predominantemente a varones adultos (Swerdlow *et al.*, 2017 & Pérez-Zúñiga *et al.*, 2018).

De acuerdo con el SEER (*Surveillance, Epidemiology, and End Results*) se calcula una incidencia anual de 23,500 casos nuevos. La incidencia aumenta gradualmente a partir de los 50 años. En México, esta neoplasia constituye aproximadamente el 48% del total de los LNH (Labardini *et al.*, 2011).

3.1.2 Etiología

Hasta el momento, la causa es desconocida. Sin embargo, en algunos casos es posible detectar algunos factores de riesgo tales como inmunodeficiencias (agammaglobulinemia de Bruton, deficiencias del complemento), enfermedades autoinmunes (lupus eritematoso sistémico), e infecciones crónicas o que causan inmunosupresión (Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida), así como en los pacientes sometidos a tratamientos inmunosupresores. Algunos agentes infecciosos, como el virus de Epstein Barr, juegan un papel importante en el desarrollo de ciertos tipos de linfoma (Beltran *et al.*, 2011). La mayoría de los casos de LDCBG son formas *de novo*, pero también pueden ser resultantes de la progresión o transformación de una enfermedad linfoproliferativa previa (leucemia linfocítica crónica, linfoma folicular u otros tipos de linfomas indolentes) (Romero *et al.*, 2006).

El comportamiento clínico y la respuesta al tratamiento de los distintos subtipos del LDCBG (centro germinal [CG] y célula B activada [CBA]) dependen considerablemente de la etapa de diferenciación de las células B del que se originan. Durante la reacción del centro germinal, dos modificaciones distintas del DNA de las células B alteran el receptor de las células B: la hipermutación somática y la recombinación de cambio de clase, que requieren citidina desaminasa inductora de activación (AID); ya que al activarse el linfocito B se activa esta enzima y favorece la hipermutación somática al desaminar a la citidina y convertirla en uracilo (Muramatsu *et al.*, 2000). Mediante la recombinación de cambio de clase, la IgM cambia la clase de cadena pesada de inmunoglobulina a IgG, IgA o IgE; mientras que la hipermutación somática implica mutaciones de la región variable de inmunoglobulina, que crean una población de células B con afinidad aumentada (o disminuida) por un antígeno particular. Estas modificaciones genéticas son esenciales para una respuesta inmune

normal, pero también son una fuente de daño en el DNA que puede volverse patológico en los linfomas. Los linfomas subtipo CG expresan cientos de genes que definen las células B del centro germinal, incluidos *BCL6*, *MTA3*, *SPIB*, *BACH2*, *OCT2*, *OCAB* e *IRF8*. El clon maligno continúa sufriendo hipermutación somática, y las células a menudo cambian las clases del locus de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas. Por el contrario, los linfomas CBA tienen el programa de expresión de células plasmáticas, incluido el factor de transcripción *XBP1*, el regulador maestro de la secreción de inmunoglobulina. La activación constitutiva de la vía NF- κ B hace que los linfomas CBA expresen el factor de transcripción *MUM1* y esto puede llevarlos hacia la diferenciación en células plasmáticas. Sin embargo, los linfomas CBA adquieren alteraciones genéticas que interfieren con *Blimp-1*, bloqueando así la diferenciación completa en las células plasmáticas (Figura 2) (Lenz & Staudt, 2010).

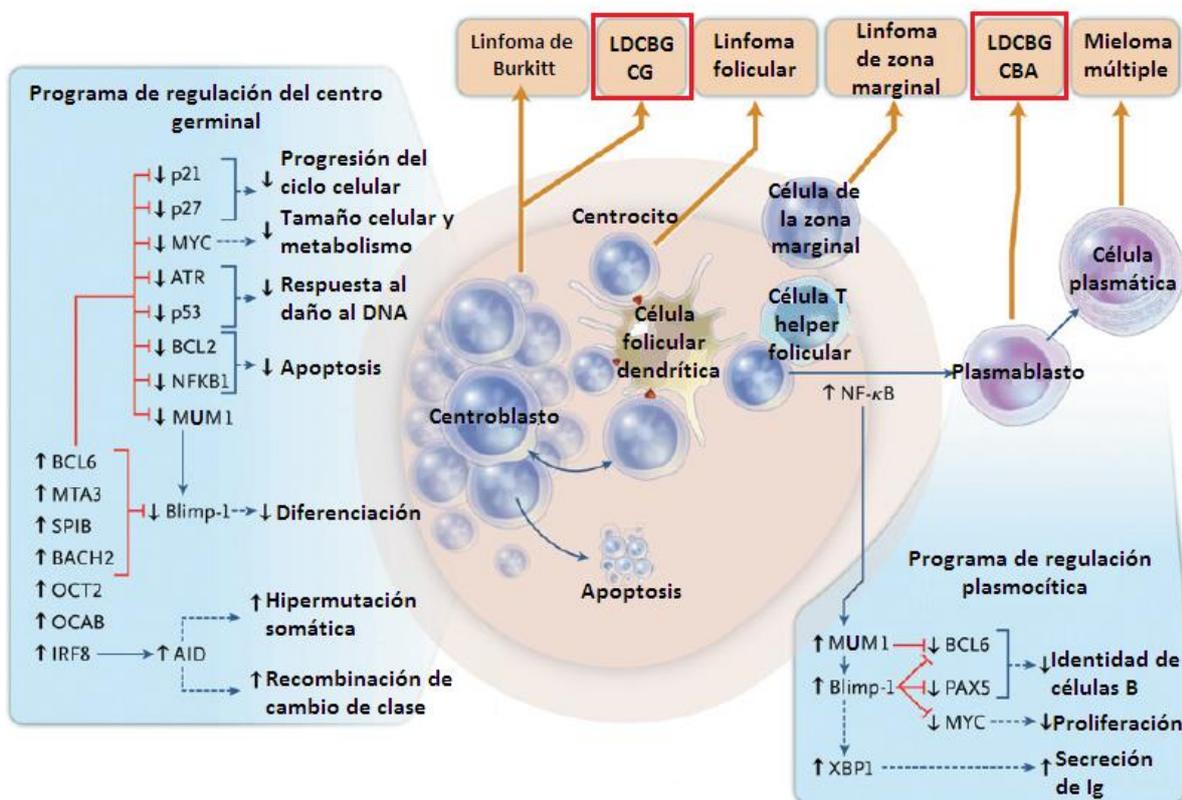


Figura 2. Diferenciación de la célula B y linfomagénesis.

En la imagen se indica el origen de distintas neoplasias de células B, así como la regulación génica del centro germinal y plasmocítica. (Tomada y modificada de Lenz & Staudt, 2010).

3.1.3 Clasificación

La clasificación actual de la Organización Mundial de la Salud de los tumores de los tejidos hematopoyéticos y linfoides ha subdividido los linfomas difusos de células B grandes en

variantes morfológicas, subgrupos moleculares e inmunofenotípicos y distintas entidades de enfermedad, como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Clasificación del linfoma difuso de células B grandes.

(Tomado de Swerdlow *et al.*, 2017).

<p>Linfoma Difuso de Células B Grandes</p> <p>Variantes morfológicas</p> <ul style="list-style-type: none">CentroblásticoInmunoblásticoAnaplásicoOtras variantes raras <p>Subgrupos moleculares</p> <ul style="list-style-type: none">Centro Germinal (GC, <i>Germinal Center</i>)Célula B Activada (ABC, <i>Activated B Cell</i>)
<p>Otros linfomas de Células B Grandes</p> <ul style="list-style-type: none">Linfoma de células B grandes rico en células T/histiocitosLinfoma difuso de células B grandes primario de SNCLinfoma difuso de células B grandes primario cutáneoLinfoma difuso de células B grandes EBV-positivoLinfoma difuso de células B grandes asociado con inflamación crónicaGranulomatosis linfomatoideLinfoma difuso de células B grandes con rearrreglos de <i>MUM1</i>Linfoma difuso de células B grandes primario mediastinal (tímico)Linfoma difuso de células B grandes intravascularLinfoma difuso de células B grandes ALK-positivoLinfoma plasmablásticoLinfoma difuso de células B grandes HHV8-positivoLinfoma de efusión primaria
<p>Linfoma de células B de alto grado</p> <ul style="list-style-type: none">Linfoma de células B de alto grado con rearrreglos de <i>MYC</i> y <i>BCL2</i> y/o <i>BCL6</i>Linfoma de células B de alto grado
<p>Linfoma de células B inclasificable</p> <ul style="list-style-type: none">Linfoma de células B inclasificables, con características intermedias entre Linfoma Difuso de Células B Grandes y Linfoma de Hodgkin Clásico

3.1.4 Características clínicas

Al diagnóstico, la mayoría de los pacientes presentan adenopatías rápidamente progresivas (Figura 3), por lo que alrededor del 50% de los pacientes se diagnostican en estadios avanzados y con diseminación tumoral. Si bien es una enfermedad de predominio ganglionar (37% cuello, 21% axilas y 18% región inguinal), el sitio inicial de presentación puede ser extranodal, siendo más frecuentemente afectados el mediastino, SNC, ojo, senos paranasales, piel, pulmones, tubo digestivo, testículo, hígado, bazo, hueso, médula ósea, aparato genitourinario, ovarios y glándula mamaria (Jaime & Gómez, 2015).



Figura 3. Crecimiento ganglionar cervical en LNH.

(Tomada de Vargas & Hurtado, 2011).

Hasta un 60% de los enfermos pueden presentar síntomas B, los cuales son diaforesis (sudoración nocturna), fiebre y pérdida de más del 10% del peso corporal en los 6 meses anteriores al diagnóstico (Mejía *et al.*, 2015).

La estadificación clinicopatológica del LDCBG se clasifica de acuerdo con el sistema Ann Arbor, diseñado en 1971 para su utilización en el linfoma de Hodgkin y modificado en 1989 en la Conferencia de Cotswold (Tabla 2 y Figura 4).

Tabla 2. Clasificación de Ann-Arbor modificada por Cotswold.

(Tomado y modificado de Pérez-Zúñiga *et al.*, 2018).

Estadio	Área afectada
I	Afectación de una única región ganglionar o una única estructura linfoide (bazo, timo, anillo de Waldeyer)
II	Afectación de dos o más regiones ganglionares en el mismo lado del diafragma
III	Afectación de regiones linfáticas a ambos lados del diafragma que pueden ir acompañadas de afectación extralinfática localizada
IV	Afectación diseminada de uno o más órganos extralinfáticos, asociada o no con enfermedad en los ganglios linfáticos
Anotaciones a la definición de estadio	
<p>A: Asintomático B: Síntomas B presentes X: Enfermedad voluminosa: conglomerado ganglionar mayor a 10 cm en diámetro o se compromete el mediastino mayor de un tercio del diámetro torácico. E: Afectación extranodal por contigüidad.</p>	

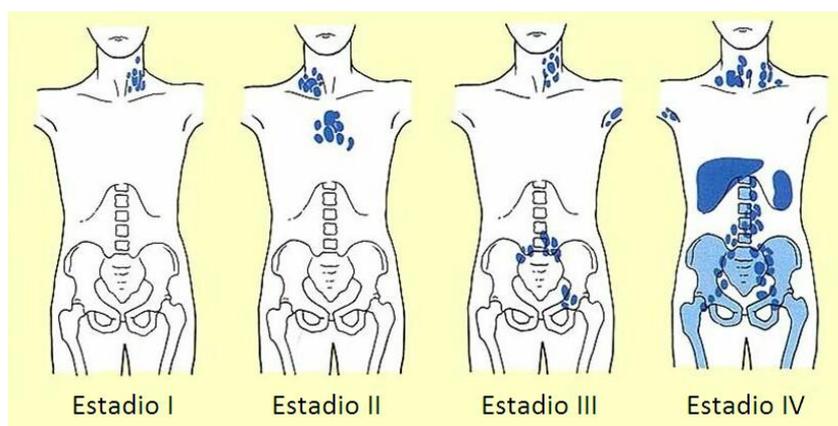


Figura 4. Clasificación de Ann Arbor modificada por Cotswold

(Tomada y modificada de Mezhoud, 2019).

El aumento sérico de la β -2 microglobulina (β -2-M) y de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) tiene relevancia pronóstica. La β -2 microglobulina se expresa especialmente en la membrana de los linfocitos, participa en la presentación antigénica y su aumento sérico se puede deber a esta función frente a neoplasias o al recambio celular que hay en los tumores (Cresswell *et al.*, 1974). Por otro lado, la LDH participa en el metabolismo tumoral. Una de las características del cáncer es un metabolismo alterado en el que las células cancerosas

dependen de la respiración anaeróbica como la principal fuente de energía. Esto implica la producción de lactato a partir de glucosa incluso en un entorno con suficiente oxígeno (efecto Warburg). Por lo tanto, las células tumorales absorben el exceso de glucosa y la usan para un crecimiento y proliferación acelerados. Varios estudios han demostrado la asociación de LDH con varias características de la enfermedad, como síntomas, tamaño del tumor, organomegalia, etc. (Yadav *et al.*, 2016).

3.1.5 Diagnóstico

Actualmente, el estándar de oro para el diagnóstico de LDCGB es el examen histopatológico. Las exploraciones complementarias indispensables en el estudio de extensión incluyen la historia clínica del paciente y su exploración física, estudios de laboratorio y técnicas de diagnóstico por imagen (Basqueira *et al.*, 2012 & Sans-Sabrafen *et al.*, 2006).

3.1.5.1 Exploración física

El examen físico debe incluir, además de la exploración de los territorios ganglionares clásicos, áreas frecuentemente poco exploradas, como el anillo de Waldeyer, los ganglios epitrocleares, occipitales y femorales, así como los ganglios inguinales de los linfomas con origen ganglionar (Sans-Sabrafen *et al.*, 2006).

Durante la exploración física es importante la valoración del estado funcional del paciente. En el LDCBG se utiliza la escala ECOG (*Eastern Cooperative Oncology Group*), la cual consiste en 6 niveles de funcionalidad que van desde el funcionamiento normal (ECOG= 0) hasta la muerte (ECOG= 5), tal como se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Escala Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG)

(Tomada y modificada de Pérez-Cruz & Acevedo, 2014).

Puntaje	Descripción
0	Completamente activo, capaz de realizar todas las actividades previas a la enfermedad, sin restricción
1	Restringido en actividad física extrema, capaz de caminar y realizar trabajos livianos
2	Capaz de caminar y de autocuidado, pero incapaz de realizar cualquier tipo de trabajo. Deambula más de 50% de las horas que está despierto
3	Capaz de autocuidado limitado, se mantiene postrado o en silla más de 50% de las horas que está despierto
4	Completamente incapacitado. No puede realizar autocuidado. Totalmente confinado en cama o silla
5	Muerte

3.1.5.2 Estudios de laboratorio

En el diagnóstico del LDCBG, es imprescindible la biometría hemática completa, tiempos de coagulación, pruebas de función renal y hepática, lactato deshidrogenasa (LDH) y β -2 microglobulina (β -2-M), y serología del virus de inmunodeficiencia humana (VIH), hepatitis B y C (VHB y VHC, respectivamente) entre otros (Sans-Sabrafen *et al.*, 2006).

3.1.5.3 Biopsia ganglionar

El diagnóstico de linfoma y la identificación del subtipo específico requiere estudio histológico donde se observa patrón característico de infiltración difusa por células B grandes, estudio inmunohistoquímico para CD20, CD19, CD79a, BCL2, CD10, BCL6 y MUM1, y en ocasiones estudios citogenéticos y moleculares. Es recomendable el estudio del ganglio completo o una muestra amplia de tejido infiltrado. Sin embargo, en algunos casos, se puede recurrir a la biopsia con aguja gruesa cuando no sea posible obtener muestra de adenopatía o de tejido por biopsia (Miralles *et al.*, 2017).

3.1.5.4 Estudios de imagen

Los estudios de imagen en los linfomas tienen distintos usos, entre los que destacan la estadificación, el monitoreo del tratamiento, la valoración de la remisión de la enfermedad, así como el pronóstico pretrasplante (Noboa *et al.*, 2018).

Actualmente se utiliza la Tomografía de Emisión de Positrones (PET), la cual se basa en los principios de la medicina nuclear. A partir de la inyección de un radiofármaco traza un mapa metabólico corporal con distribución normal o patológica (áreas hipo o hipermetabólicas). El radiofármaco utilizado es la ^{18}F -FDG (2-fluoro-2-deoxy-D-glucosa), un análogo de la glucosa marcado con Flúor 18, que es un emisor de positrones. El *Standardized Uptake Value* (SUV) sirve como un marcador cuantitativo de la actividad metabólica y la evaluación de la respuesta se clasifica según la escala de cinco puntos de Deauville. En los pacientes con LDCBG se recomienda al principio del tratamiento para su estadificación y pronóstico, después del tercer o cuarto ciclo de quimioterapia (PET intervalo), así como al finalizar el tratamiento (Noboa *et al.*, 2018 & Eleta, 2008).

3.1.6 Factores pronósticos

Los pacientes con LDCBG presentan heterogeneidad en la evolución clínica y en la respuesta al tratamiento, lo cual se relaciona con ciertas características clínicas, inmunohistoquímicas, bioquímicas y genéticas; y algunas de ellas se comportan como factores determinantes para el pronóstico, por lo cual su evaluación al diagnóstico es de vital importancia (Hunt & Reichard, 2008).

3.1.6.1 Índice Pronóstico Internacional Revisado (R-IPI)

El Índice Pronóstico Internacional (IPI) fue la primera herramienta utilizada para predecir la supervivencia en los pacientes con LDCBG. La combinación de cinco parámetros clínicos de fácil medición (edad >60 años, estado funcional de acuerdo con la escala ECOG >1, actividad de LDH elevada, estadio clínico Ann Arbor avanzado y enfermedad extraganglionar en más de un sitio) permite establecer 4 grupos de riesgo (bajo, intermedio-bajo, intermedio-alto y alto), asignando un punto para cada una de las características que se presente en el paciente (The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project, 1993).

Pese a su importancia pronóstica y al gran nivel de evidencia estadística de este modelo predictivo de supervivencia, tras la implementación del anticuerpo monoclonal rituximab al régimen de tratamiento CHOP su utilidad fue cuestionada. En 2007, Senh *et al* propusieron

el uso de esta misma clasificación revisada, conocida como IPI revisado en la que se evalúa la clasificación IPI en pacientes tratados con rituximab (Sehn *et al.*, 2007). Teniendo en cuenta el comportamiento de las curvas de supervivencia, se reducen los grupos de riesgo a tres: muy favorable, favorable y pobre (Tabla 4).

Tabla 4. Grupos de riesgo según el Índice Pronóstico Internacional Revisado (R-IPI).

(Tomada de Sehn *et al.*, 2007).

Calificación	Grupo de riesgo	Supervivencia libre de progresión a 4 años (%)
0	Muy favorable	94
1-2	Favorable	80
3-5	Pobre	53

3.1.6.2 Subclasificación molecular

El conocimiento de la linfomagénesis y el desarrollo de las técnicas de biología molecular ha permitido identificar dos subtipos moleculares del LDCBG: Centro Germinal (CG) o Célula B Activada (CBA), así como un grupo de casos que no podían clasificarse en ninguna categoría. Estos subgrupos difieren en la expresión de miles de genes, activación de vías de señalización y resultado clínico; por lo que se consideran pronósticos. Además, permiten predecir la sensibilidad a las terapias dirigidas emergentes como bortezomib, lenalidomida, ibrutinib y venetoclax (Young *et al.*, 2015; Jo *et al.*, 2019; Castellino *et al.*, 2018; Younes *et al.*, 2019; Goy *et al.*, 2019 & Morschhauser *et al.*, 2018).

Mediante los perfiles de expresión génica (*Gene expression profiling*, GEP) se ha determinado la firma de expresión de estos subtipos. La firma de expresión génica que distingue al subtipo CG incluye muchos marcadores conocidos de diferenciación del centro germinal entre los que se encuentran los genes *CD10*, *CD38*, *BCL6*, *A-myb*, *LMO2*, *GCET1* y *OGG1*. Por otra parte, se encontró que la firma de expresión génica del subtipo CBA sobreexpresa genes del perfil correspondiente a las células de sangre periférica sometidas a procesos de mitogénesis y activación, como son *MUM1*, *FOXP1* y *FLIP* (Figura 5) (Alizadeh *et al.*, 2000).

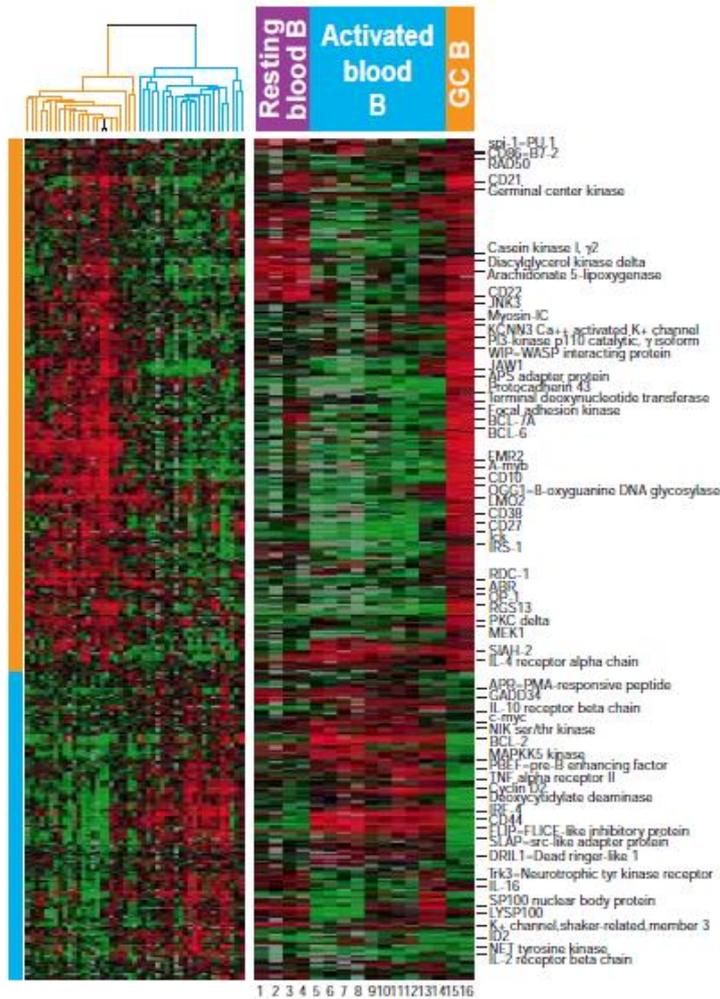


Figura 5. Descubrimiento de subtipos de LDCBG mediante perfiles de expresión génica.

Dos subgrupos, LDCBG subtipo CG (naranja) y LDCBG subtipo CBA (azul) fueron definidos por perfiles de expresión génica. El color verde indica una expresión reducida, mientras que el rojo indica expresión elevada del gen analizado (Tomada de Alizadeh *et al*, 2000).

La caracterización del LDCBG mediante GEP tiene un importante impacto pronóstico. En diversos estudios se ha reportado que los pacientes con subtipo CG tienen una mayor probabilidad de supervivencia libre de eventos (SLE) y supervivencia general (SG) que los pacientes con subtipo CBA bajo esquema de tratamiento R-CHOP (Figura 6).

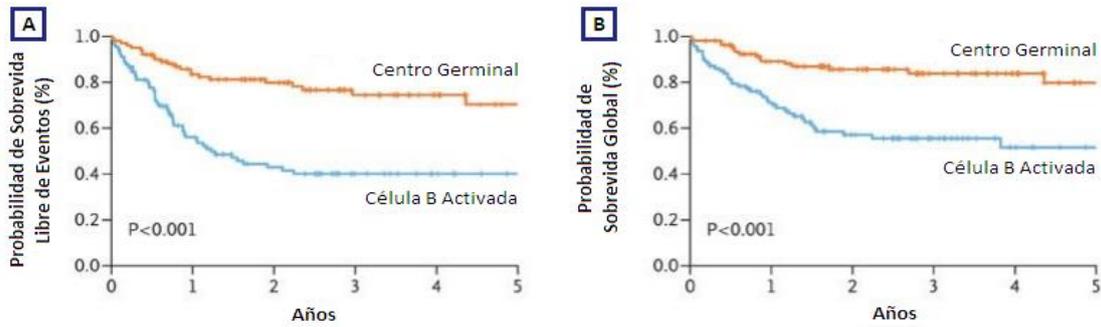


Figura 6. Predictores de supervivencia de expresión genética en pacientes con LDCBG tratados con R-CHOP.

(A) SLE a 5 años. (B) SG a 5 años. (Tomada y modificada de Lenz *et al*, 2008).

3.1.6.2.1 Algoritmo de Hans

Si bien el GEP permite subclasificar el LDCBG en dos subtipos moleculares, su aplicación está restringida a fines de investigación, además de ser una técnica costosa. Esto ha llevado a desarrollar enfoques basados en inmunohistoquímica para la clasificación molecular (Coutinho *et al.*, 2013). Debido a esto, se han propuesto varios algoritmos que permiten distinguir entre los subgrupos moleculares, basados en un panel de tinciones inmunohistoquímicas en tejidos FFPE (*Formalin-Fixed Paraffin-Embedded*, fijados en formalina embebidos en parafina) para los marcadores de células B del centro germinal (CD10, BCL6, GCET1 y LMO) y los marcadores de célula B activada (MUM1 y FOXP1) (Hwang *et al.*, 2013). Entre ellos, el algoritmo de Hans, que se basa en la expresión de CD10, BCL6 y MUM1, es el más aceptado y utilizado en la práctica clínica debido a la concordancia que presenta con el GEP (71% en el subtipo CG y 88% en CBA) (Figura 7) (Hans *et al.*, 2004).

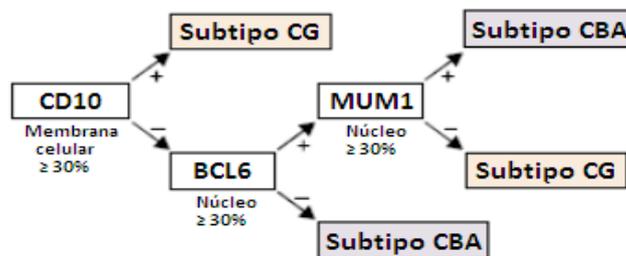


Figura 7. Algoritmo de Hans.

De acuerdo a la tinción inmunohistoquímica, si CD10 es positivo se considera que el LDCBG es subtipo CG, de lo contrario se analiza BCL6. Si BCL6 es negativo, el subtipo será CBA, mientras que si es positivo se realiza la tinción para MUM1. Si MUM1 es positivo el subtipo será CBA, si es negativo será subtipo CG (Tomada y modificada de Hwang *et al.*, 2013).

A continuación, se describen las proteínas que conforman el panel inmunohistoquímico para la subclasificación mediante el algoritmo de Hans y los genes que las codifican, así como la función que cumplen en el LDCBG.

3.1.6.2.1.1 CD10

El antígeno de diferenciación 10 (*Cluster of differentiation 10*, CD10), también conocido como antígeno de leucemia linfoblástica aguda común (CALLA), es una metaloendoproteasa común dependiente de zinc que inactiva varios péptidos de señalización. Se expresa en leucemia linfoblástica B, linfoma folicular, linfoma de Burkitt, y algunos casos de LDCBG; Sin embargo, esta proteína no se limita a las células leucémicas y se encuentra en una variedad de tejidos normales, como células de tejido epitelial (Maguer-Satta *et al.*, 2011). El gen que codifica esta proteína se encuentra en el cromosoma 3q21-27, está compuesto por 24 exones y abarca 80 kb. Se expresa específicamente en estadios progenitores linfoides tempranos que muestran un fenotipo inmaduro que sugiere su papel en el desarrollo y diferenciación de las células linfoides (Mishra *et al.*, 2016). En su papel como marcador inmunohistoquímico, Hans *et al* describieron que, debido a los diferentes resultados clínicos encontrados en estudios retrospectivos, no se podía afirmar que la sola expresión de *CD10* pudiera ser usada para predecir supervivencia (Hans *et al.*, 2004).

3.1.6.2.1.2 BCL6

El gen del linfoma de células B 6 (*B-Cell Lymphoma 6*, *BCL6*) se localiza en el cromosoma 3q27.3, comprende 24 kb, está compuesto por 12 exones y codifica una proteína de 95 kDa. *BCL6* es un represor de transcripción necesario para las células B maduras durante la reacción en el centro germinal, expresándose exclusivamente en esta fase de diferenciación. Para ejercer su función regula diferentes vías de señalización, inhibiendo la diferenciación a células plasmáticas, la respuesta al daño del DNA, la apoptosis y varias rutas que intervienen en los estadios finales de la diferenciación de los linfocitos B. La expresión desregulada de *BCL6* desempeña un papel fundamental en el mantenimiento del fenotipo proliferativo y la supervivencia de los linfomas de células B que surgen del centro germinal. *BCL6* juega un papel clave en la modulación de genes implicados en la detección y respuesta al daño del DNA, favoreciendo así la acumulación de mutaciones oncogénicas adicionales (Iglesias, 2017).

Se ha encontrado que la expresión individual de *BCL6* funciona como factor pronóstico,

independientemente de la edad, estado funcional, estadio clínico del linfoma, niveles séricos de LDH y sitios extraganglionares de la enfermedad en el momento del diagnóstico (Rojas *et al.*, 2016). Múltiples estudios inmunohistoquímicos y análisis que utilizan la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa cuantitativa (RT-qPCR) han demostrado que su expresión individual o en combinación con otros marcadores del centro germinal predice un resultado favorable en LDCGB (Barrans *et al.*, 2002 & Lossos *et al.*, 2004).

3.1.6.2.1.3 MUM1

El oncogén del mieloma múltiple-1 (*MUM1*) se encuentra en el cromosoma 6p25, tiene 9 exones y codifica un factor de transcripción que juega un papel clave en el desarrollo de las células linfoides (Gualco *et al.*, 2010). En el sistema hematolinfoide, *MUM1* se expresa principalmente en células B y células linfoides T activadas, compartiendo algunas propiedades con IRF8, otro miembro de la familia, que también está restringido principalmente al sistema linfoide (Tanaka & Taniguchi, 2000). *MUM1* se considera un mediador crítico del desarrollo de células linfoides, mieloides y dendríticas. En las células B, *MUM1* se expresa en un pequeño subconjunto de células del centro germinal (GC) comprometidas con la diferenciación de células plasmocíticas o de memoria y en células plasmáticas (Falini *et al.*, 2000). En el LDCBG su expresión se considera decisiva para determinar el subtipo CBA (Hans *et al.*, 2004). Se ha evaluado su uso como biomarcador para predecir el resultado clínico, encontrando que la expresión de *MUM1* en inmunohistoquímica mayor al 25% tiene impacto en la SG a 3 años (Sofo *et al.*, 2016).

3.1.6.3 Biomarcadores con valor pronóstico

En el LDCBG, además de la determinación de CD10, BCL6 y *MUM1*, se evalúan distintos biomarcadores tales como CD20, CD5, PAX5, CD79a, KI67 y BCL2, entre otros. Estos biomarcadores tienen valor predictivo, además de que su detección ayuda a tomar las decisiones de tratamiento apropiadas para el paciente.

CD20 es una fosfoproteína no glicosilada expresada en la superficie de todas las células B maduras. El CD20 se expresa en todas las etapas del desarrollo de las células B, excepto en la primera y la última. Su detección es importante para determinar si es necesaria la adición de rituximab, un anticuerpo monoclonal anti-CD20, al régimen de quimioterapia (Jo *et al.*, 2010). En los casos en que CD20 sea negativo se realiza la detección de otros marcadores adicionales de linaje B tales como PAX5 y CD79a (Basqueira *et al.*, 2012). Asimismo, se ha encontrado la expresión aberrante de algunos marcadores de linaje T,

siendo el más representativo CD5. Distintos estudios han reportado que los LDCBG CD5+ presentan típicamente características clínicas agresivas y resultados adversos (Na *et al.*, 2019). Otro biomarcador con valor pronóstico es la proteína nuclear no histona Ki67, que se sintetiza al comienzo de la proliferación celular. La expresión de Ki67 se ha utilizado ampliamente en la práctica clínica como índice para evaluar la actividad proliferativa del linfoma. La expresión alta de Ki67 se asoció en gran medida con una peor SG para el LNH (He *et al.*, 2014 & Li *et al.*, 2012).

Entre estos biomarcadores, destaca *BCL2*, el cual es un protooncogén localizado en el cromosoma 18q21.33 que se extiende en 3 exones (Tibiletti *et al.*, 2009). Este gen codifica una proteína que se localiza en la membrana externa mitocondrial, en la envoltura nuclear y en el retículo endoplásmico de linfocitos B y T normales, y su expresión aumenta en los centros germinales estimulados para la proliferación (García *et al.*, 2006 & Iglesias, 2017). El protooncogén *BCL2* bloquea una vía común de apoptosis, impidiendo que el DNA dañado actúe como una señal de activación de muerte celular programada. Por lo tanto, su acción es prevenir la muerte prematura de las células mitóticas y prolongar la supervivencia celular para favorecer la aparición de más mutaciones (Ramírez *et al.*, 2014). La sobreexpresión de *BCL2* se asocia con la resistencia a los fármacos en distintas neoplasias (Delbridge *et al.*, 2016). La importancia pronóstica de la expresión de *BCL2* en los subtipos moleculares ha mostrado resultados contradictorios. Mientras algunos estudios demuestran que la sobreexpresión de *BCL2* está asociada a un resultado desfavorable en el subtipo CBA (Song *et al.*, 2009 & Tsuyama *et al.*, 2017), otros reportan que es un biomarcador de mal pronóstico en el LDCBG subtipo CG (Dunleavy & Wilson, 2011).

Asimismo, se ha propuesto el uso de otros marcadores, determinados mediante RT-qPCR en CTCs. Cerón en su tesis de maestría determinó los niveles de expresión de biomarcadores metastásicos, tales como *Ki67*, *BCL6*, *BCL10*, *CK19*, *VEGFR1*, *TWIST1*, *h-TERT* y *MAGE-A3*; encontrando diferencias significativas entre la expresión de los genes *BCL6*, *BCL10*, *Ki67*, *CK19* y *VEGFR1* en individuos sanos y pacientes, mientras que *BCL6* y *h-TERT* se consideraron biomarcadores de pronóstico adverso (Cerón, 2019).

3.1.7 Tratamiento

El tratamiento de primera línea para el LDCBG es la inmunoterapia con el esquema R-CHOP: Rituximab, Ciclofosfamida, Hidroxicarbocina (Doxorrubicina), Oncovin (Vincristina) y Prednisona. La dosis y administración en el Hospital General de México se presenta en la Tabla 5.

Tabla 5. Esquema de tratamiento R-CHOP en el Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga”.

Fármaco	Dosis	Vía de administración	Días de tratamiento	Intervalo entre ciclos (días)	Ciclos
Rituximab	500 mg/m ²	Intravenosa	1	21	6
Ciclofosfamida	1200 mg/m ²	Intravenosa	1		
Doxorrubicina	70 mg/m ²	Intravenosa	1		
Vincristina	2 mg/m ²	Intravenosa	1		
Prednisona	100 mg/día	Oral	1-5		

El rituximab es un anticuerpo monoclonal que se une específicamente con el antígeno de membrana CD20. Sus mecanismos de acción incluyen la citotoxicidad complemento-dependiente y la citotoxicidad celular anticuerpo-dependiente. Este anticuerpo monoclonal también actúa sobre la proliferación y diferenciación de las células linfoides malignas, regulando el ciclo celular e induciendo la apoptosis a través de los canales de calcio, la activación de proteínas tirosin-quinasas y la activación de la caspasa 3 (Espinosa *et al.*, 2010). Tras su adición al régimen de quimioterapia CHOP demostró un incremento significativo de la tasa de respuesta completa y una mejoría en la SLE y la SG (Coiffier *et al.*, 2002).

3.1.7.1 Terapias dirigidas

En los últimos años, se han desarrollado agentes novedosos con especificidad tumoral más alta y toxicidad generalizada más baja, que proveen una alternativa inicial para pacientes frágiles al R-CHOP y para los pacientes refractarios o en recaída (Müller *et al.*, 2017). El LDCBG subtipo CBA tiene una sobrevida reducida después de la quimioterapia, con respecto al subtipo CG, y se caracteriza por la activación constitutiva de la vía del factor nuclear kappa B (NF-κB), que puede inhibir la quimioterapia. Dunleavy *et al* postularon que la inhibición de esta vía de señalización podría sensibilizar al LDCBG subtipo CBA a la quimioterapia y mejorar el resultado del tratamiento (Dunleavy *et al.*, 2009).

Ejemplos de agentes que han demostrado mejorar la actividad de la quimioterapia R-CHOP son bortezomib, lenalidomida, ibrutinib y venetoclax, entre otros. Bortezomib es un inhibidor de proteosoma que puede suprimir la actividad de NF-κB en el LDCBG CBA, al igual que el agente inmunomodulador lenalidomida (Orlowski & Kuhn, 2008; Ma & Su, 2018). Ibrutinib

produce la interrupción de la señalización del receptor de células B, que tiene actividad antitumoral (Davis *et al.*, 2010). Venetoclax es un inhibidor de *BCL2* altamente selectivo que mejoró la eficacia de la quimioterapia en pacientes con LDCBG con *BCL2* positivo (Morschhauser *et al.*, 2018).

3.2 Células TumORAles Circulantes

La biopsia líquida es considerada una muestra biológica de utilidad diagnóstica y pronóstica. Permite diagnosticar la enfermedad mediante la detección en sangre de material genético o células procedentes del tumor, comprobar la existencia de enfermedad mínima residual, evaluar el efecto del tratamiento midiendo a tiempo real las fluctuaciones de material genético procedente del tumor y detectar posibles alteraciones genéticas que indiquen resistencias a los fármacos empleados (Camus *et al.*, 2017). El concepto de biopsia líquida es bien conocido desde hace varios años, principalmente con tumores sólidos para los cuales se ha podido demostrar la presencia de células tumorales circulantes (CTCs), DNA libre de células plasmáticas (cfDNA), DNA tumoral circulante (ctDNA) y exosomas (Diaz & Bardelli, 2014; Lowes *et al.*, 2016; Alizadeh *et al.*, 2015 & Wang *et al.*, 2015).

Las CTCs son células presentes en sangre periférica que proceden del tumor primario o de su metástasis. Pese a encontrarse en una baja cantidad estas células constituyen un sensible marcador tumoral y cada vez se vinculan más a la detección precoz, diagnóstico, monitorización y pronóstico del cáncer. Por este hecho nace la necesidad de encontrar técnicas capaces de detectar estas células, así como su heterogeneidad (Cano, 2019).

La determinación de CTCs no es un concepto nuevo, en 1869 Ashworth publicó un caso donde las células malignas similares a las del tumor primario circulaban en sangre periférica (Ashworth, 1869). Estas observaciones llevaron a suponer durante mucho tiempo que su presencia significaba una progresión de la enfermedad neoplásica maligna y que se podía relacionar directamente con las metástasis tumorales. Pero su verdadero significado biológico no había podido ser establecido debido a su escaso número y por no contar con técnicas que permitieran su aislamiento e identificación eficaz (Kagan *et al.*, 2002 & Jeffrey *et al.*, 2004).

Las CTCs poseen potencial para generar metástasis. Para que la metástasis ocurra, la célula tumoral requiere modificar su fenotipo, esto lo hace a través de un proceso biológico llamado transición epitelio mesenquimal (TEM). Así, en este proceso se pierden marcadores de epitelio como E-cadherina y citoqueratinas, características de su sitio de origen y se expresan marcadores mesenquimatosos, así como factores de transcripción que regulan esta transformación en la célula tumoral (*SNAIL*, *SLUG*, *ZEB1*, *ZEB2*). Las

CTCs pueden expresar marcadores tanto de epitelio como de mesénquima, por la transición en la que se encuentran y que las distinguen del sitio de origen de donde se desprenden. Las CTCs son una población heterogénea que expresan distintos marcadores como EpCAM, pancitoqueratina, vimentina y no expresan algunos otros como CD45 (González, 2019 & Ignatiadis *et al.*, 2015).

3.2.1 Enriquecimiento y detección de CTCs

Las CTCs son células tumorales raras, en sangre periférica se pueden detectar aproximadamente 1 CTC por ml de sangre, liberada por tumores primarios o metástasis. La selección de CTCs suele ser el primer paso de la detección, con enriquecimiento positivo o negativo. Luego, un paso de detección distingue a las CTCs de las células normales restantes (Ferreira *et al.*, 2016). El paso de selección se basa en las propiedades bioquímicas o biofísicas de las CTCs. Las diferencias en la expresión de antígenos de superficie celular permiten la selección positiva de CTCs y la selección negativa de leucocitos. En el carcinoma, el antígeno más comúnmente utilizado para la inmunoselección positiva de CTCs es la molécula de adhesión de células epiteliales (EpCAM), que es expresada por la mayoría de las células de carcinoma. La inmunoselección negativa de leucocitos generalmente se dirige a CD45, un antígeno común leucocitario. La selección de CTCs se basa en diferencias de tamaño, deformabilidad, características bioeléctricas o densidad entre CTCs y leucocitos. Después del enriquecimiento, la verificación de la identidad de las células capturadas se basa generalmente en imágenes de alta resolución combinadas con tinción inmunocitofluorescente. Las técnicas más sofisticadas incluyen la caracterización genómica, transcriptómica o proteómica de alto rendimiento de células aisladas (Figura 8) (Cabel *et al.*, 2017).

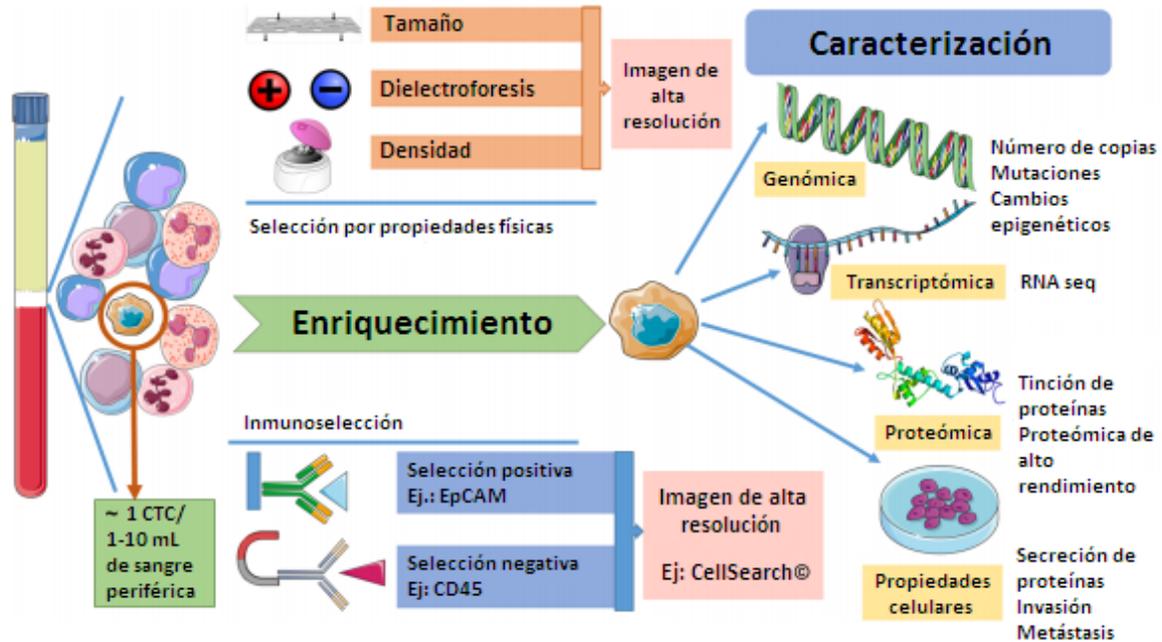


Figura 8. Técnicas de detección de CTCs.

(Tomado y modificado de Cabel *et al.*, 2017).

Los avances tecnológicos actuales han permitido desarrollar diferentes métodos para la determinación de CTCs en los laboratorios clínicos, ya sean morfológicos (ISET [*Isolation by Size of Epithelial Tumor cells*], basados en gradiente de densidades; (Oncoquick), o inmunomagnéticos (MACS® [*Magnetic Activated Cell Sorting system*], AdnaTest®, RARETM® [*RosetteSep-Applied imaging Rare Event*], FAST® [*Fiber-optic Array Scanning Technology*], LSC® [*Laser Scanning Cytometer*], CellSearch®). Además, se dispone de microscopios automatizados que permiten una exploración más rápida (ACIS® [*Automated Cellular Imaging System*], CellSpotter y ARIOL®) (Weissleder & Pittet, 2008).

El sistema semiautomático CellSearch Epithelial Cell Kit (Veridex®) de determinación de CTCs es el único aprobado actualmente por la FDA (*Food and Drug Administration*) como un predictor independiente de supervivencia global y supervivencia libre de progresión en pacientes con metástasis de mama, colon y cáncer de próstata cuando se aplica en el contexto clínico concreto. Es un sistema que aprovecha la expresión de la molécula de adhesión celular epitelial EpCAM y enriquece la muestra con fluido férrico y anticuerpos dirigidos contra EpCAM unidos a bandas inmunomagnéticas. Las células epiteliales circulantes son aisladas mediante campos magnéticos y posteriormente teñidas con 4',6-diamidino-2-fenilindol, 4',6-diamidino fenil-indol (DAPI). Para distinguir las células epiteliales de los leucocitos se utilizarán anticuerpos monoclonales marcados con fluorocromos específicos para leucocitos (CD45-alfococianina) y para células epiteliales (citoqueratinas 8, 18, 19-ficoeritrina [CK-PE]). Posteriormente las CTCs se identifican y enumeran mediante

el analizador CellSpotter, un microscopio semiautomático de fluorescencia que mediante un *software* específico permite reconocer las CTCs (Figura 9) (Weissleder & Pittet, 2008).

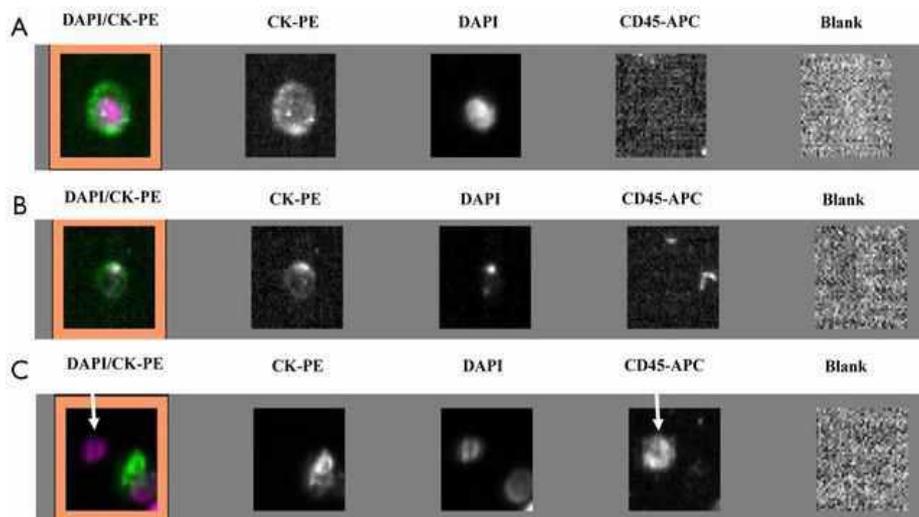


Figura 9. CTCs detectadas en pacientes con cáncer de pulmón mediante CellSearch Epithelial Cell Kit.

(A) La célula con una morfología redonda, un núcleo visible DAPI-positivo, tinción CK-PE positiva en el citoplasma y tinción negativa para CD45 se considera como CTCs intacta típica; (B) imagen de celda no incluida en el recuento de CTCs; (C) Las células positivas para CD45 (flechas) no se consideran CTCs. (Tomada de Ilie *et al*, 2014).

En resumen, los resultados obtenidos en los diferentes ensayos clínicos de los que se dispone actualmente con CTCs sugieren que la capacidad de lanzar células en la circulación es una propiedad intrínseca del tumor, y que su presencia se puede iniciar en etapas precoces del desarrollo y en la progresión tumoral. Las células tumorales se pueden detectar en la sangre y la médula ósea de pacientes con cáncer, sin un contexto clínico histopatológico o incluso signos de metástasis, y por tanto ofrecen información única, que cuando se aplica adecuadamente puede individualizar el tratamiento del paciente. El rápido desarrollo tecnológico en la determinación de las CTCs abre una nueva área: la terapia específica. No sólo permiten la identificación de las CTCs, sino también su aislamiento, lo que posibilita el estudio de su información genómica (Olivier & Carballido, 2010). La utilidad del estudio de CTCs está bien establecida en diversos cánceres metastásicos, como de mama, próstata, colorrectal, pulmón, hepatocelular, vejiga, ovarios, entre otros (Podtar & Lotey, 2015). Sin embargo, su uso en las neoplasias hematológicas continúa en estudio.

4. JUSTIFICACIÓN

El linfoma difuso de células B grandes (LDCBG) es la neoplasia linfoide más frecuente en adultos, representando el 48% de los casos de linfoma no Hodgkin (LNH) en México. Los pacientes presentan una alta heterogeneidad en la evolución clínica y en la respuesta al tratamiento, lo cual se relaciona con ciertas características que se comportan como factores determinantes para el pronóstico. Tal es el caso del biomarcador *BCL2*, que se asocia con un mal pronóstico debido a su función antiapoptótica que proporciona una ventaja de supervivencia para las células B malignas. Asimismo, la heterogeneidad de esta neoplasia ha propiciado el desarrollo de diferentes subclasificaciones que permitan conocer, agrupar y predecir el comportamiento clínico de los pacientes de la manera más homogénea posible. Existen varias maneras de subclasificar al LDCBG, entre las que se encuentran clasificaciones morfológicas, moleculares e inmunohistoquímicas. Entre ellas, la más comúnmente empleada es la inmunohistoquímica, que utiliza el algoritmo de Hans, basado en la expresión de *CD10*, *BCL6* y *MUM1*, para dividir a esta neoplasia según su origen en centro germinal (CG) o célula B activada (CBA). Sin embargo, esta metodología requiere de una biopsia del tumor primario como muestra biológica a estudiar, resultando una técnica invasiva para el paciente. En los últimos años se ha propuesto la detección y caracterización de Células Tumorales Circulantes (CTCs) como una alternativa no invasiva que permite monitorear en tiempo real la evolución del tumor y la respuesta terapéutica.

Debido a esto, el presente trabajo pretende determinar los niveles de expresión de los genes *BCL2*, *CD10*, *BCL6* y *MUM1* en CTCs utilizando pruebas de biología molecular de alta especificidad y sensibilidad, como RT-qPCR, aplicando el algoritmo de Hans para la subclasificación del LDCBG; que puede ser utilizado como un complemento al diagnóstico en estas neoplasias, así como otorgar una opción más segura y costeable para los pacientes.

5. HIPÓTESIS

Si se encuentra sobreexpresión de los genes *BCL2*, *CD10*, *BCL6* y/o *MUM1* en CTCs obtenidas a partir de sangre periférica de pacientes con diagnóstico de LDCBG, éste podrá ser subclasificado de acuerdo con el Algoritmo de Hans.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo General

Determinar los niveles de expresión de los genes *BCL2*, *CD10*, *BCL6* y *MUM1* en CTCs obtenidas a partir de sangre periférica de pacientes con diagnóstico de LDCBG para subclasificarlos según su célula de origen (Centro Germinal o Célula B Activada) de acuerdo con el Algoritmo de Hans.

6.2 Objetivos Particulares

- Comparar la sobreexpresión de los genes con el resultado emitido por el Departamento de Patología del Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga”.
- Determinar la expresión basal de los genes *BCL2*, *CD10*, *BCL6* y *MUM1* en individuos sanos mediante RT-qPCR para establecer el patrón de expresión diferencial entre las células sanas y las CTCs de pacientes con LDCBG.

7. DISEÑO EXPERIMENTAL

7.1 Población de estudio

7.1.1 Criterios de inclusión

- Ser paciente del Hospital General de México con diagnóstico de Linfoma Difuso de Células B Grandes.
- Mayor de 18 años.
- Contar con consentimiento informado

7.1.2 Criterios de exclusión

- Presentar comorbilidad con alguna otra neoplasia.

7.1.3 Criterios de eliminación

- No contar con expediente clínico completo.
- Muestra biológica insuficiente para extracción de material genético.

7.2 Variables de estudio

7.2.1 Variables independientes

Niveles de expresión relativos de los genes *BCL2*, *CD10*, *BCL6* y *MUM1*.

7.2.2 Variables dependientes

Subtipo molecular del LDCBG (Centro Germinal o Célula B Activada).

Tabla 6. Variables de estudio

Variable	Definición operacional	Tipo de variable	Escala de medición	Valores
Subtipo molecular	Origen histológico del LDCBG	Cualitativa	Nominal dicotómica	Centro Germinal Célula B Activada
Edad	Edad al diagnóstico	Cualitativa	Nominal dicotómica	≤60 años >60 años
Género	Determinación de género	Cualitativa	Nominal dicotómica	Femenino Masculino
LDH	Medición de la actividad de LDH sérica al diagnóstico	Cualitativa	Nominal	Baja Normal Elevada
ECOG	Estado funcional del paciente	Cualitativa	Nominal dicotómica	0-1 ≥2
Estadio clínico	Grado de diseminación en el cuerpo según la escala Ann-Arbor	Cualitativa	Nominal dicotómica	I o II III o IV
Síntomas B	Presencia de diaforesis nocturna, fiebre y pérdida de >10% de peso corporal	Cualitativa	Nominal dicotómica	Presencia Ausencia
Expresión de <i>BCL2</i>	Cuantificación relativa de los niveles de expresión mediante RT-qPCR	Cualitativa	Nominal	Ausencia Expresión normal Sobreexpresión
R-IPI	Determinación de factores de riesgo	Cualitativa	Nominal	Muy favorable Favorable Desfavorable
PET final	Evaluación de la actividad tumoral tras 6 ciclos de quimioterapia	Cualitativa	Nominal dicotómica	Respuesta completa Progresión de la enfermedad
Respuesta post-quimioterapia	Respuesta clínica tras 6 ciclos de quimioterapia	Cualitativa	Nominal dicotómica	Remisión Refractario
Muerte	Ausencia de signos vitales	Cualitativa	Nominal dicotómica	Vivo Muerto

7.3. Tamaño de la muestra

El cálculo del tamaño de la muestra se realizó con ayuda del software gPLINK (Broad Institute of Harvard) tomando en cuenta el número de casos que se presentan en el Hospital General de México por año, con un nivel de confianza del 95% y poder estadístico de 0.05. El tamaño de la muestra calculada fue de 30 pacientes con LDCBG.

7.4 Metodología

7.4.1 Material biológico

Se analizaron un total de 30 donadores sanos obtenidos del Banco de Sangre y 30 pacientes del Hospital General de México con consentimiento informado y diagnóstico histopatológico de LDCBG en distintos ciclos de tratamiento R-CHOP, analizándose un total de 71 muestras.

7.4.2 Enriquecimiento de CTCs

Las muestras fueron integradas con Ficoll en proporción 1:3 (Ficoll: Sangre periférica) y centrifugadas a 1500 rpm por 15 minutos. Se separó la interfase compuesta por células mononucleares, las cuales fueron lavadas con PBS 1X (NaCl 0.1370 M, KCl 0.0027 M, Na₂HPO₄ 0.01 M y K₂HPO₄ 0.0018 M) y almacenadas en TRIzol a -80°C hasta su uso.

7.4.3 Extracción de RNA

La extracción de RNA se realizó a través de la técnica descrita por Chomczynski y Sacchi (1987), que se basa en el uso de una solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina para la lisis de las células (TRIzol) y la separación de la muestra en dos fases (acuosa y orgánica), seguida de la extracción y precipitación del RNA total con cloroformo e isopropanol a partir de la fase acuosa. A las muestras en TRIzol se agregaron 150 µL de CH₃COOH/ CH₃COONa, 400 µL de solución fenol/ agua (1:1) y 150 µL de cloroformo; y posteriormente fueron centrifugadas a 12,000 rpm por 15 minutos. Se separó la interfase y se precipitó el RNA con etanol al 100%, incubando a -20°C de 1 a 24 horas. Después, se centrifugó a 12,000 rpm por 15 minutos y se realizaron lavados con etanol al 75%. El RNA finalmente se resuspendió en agua libre de nucleasas y se incubó a 70°C por 10 minutos. Se verificó la integridad del RNA realizando una corrida electroforética en gel de agarosa al 1.5%. La concentración y pureza del RNA se determinó por la medición de la absorbancia a 260 y 280 nm de longitud de onda mediante espectrofotometría, en una dilución 1:500.

7.4.4 Síntesis de cDNA

La síntesis de DNA complementario (cDNA) se realizó a partir de una retrotranscriptasa dependiente de RNA. El cDNA de las muestras se sintetizó a partir de 3500 ng de RNA, adicionando 1 µL de Oligo dT incubando a 70°C durante 10 minutos y se agregaron 5 µL de buffer 5X (250 mM Tris-HCl pH=8.4, 500 mM KCl, 25 mM MgCl₂, 10 mM DTT), 3 µL de dNTP, 1 µL de M-MLV RT (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase) y el volumen correspondiente de agua inyectable cbp 20 µL, incubando a 37°C por 1 hora. La enzima se inactivó incubando la muestra a 70°C por 10 minutos.

7.4.5 RT-PCR en punto final

La RT-PCR en punto final es una reacción enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una secuencia específica de cDNA durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia diana es copiada fielmente. En esta reacción de amplificación se utilizó el gen de la Beta-glucuronidasa (*GUSB*, por sus siglas en inglés) como control endógeno. Para la elección de las líneas celulares que se usaron como controles positivos para los genes de estudio se realizó una búsqueda en la literatura. Se encontró que la línea celular HL-60, correspondiente a leucemia promielocítica aguda, sobreexpresa *BCL2* (Abondanza *et al.*, 2008). La línea celular Reh, que pertenece a una leucemia linfoblástica aguda no-T, no-B, sobreexpresa tanto el marcador de inmadurez *CD10* como el gen *BCL6* (Chorváth *et al.*, 1990 & Slone *et al.*, 2016). Por último, la línea celular Jurkat, de leucemia linfoblástica aguda T, sobreexpresa *MUM1* (Adamaki *et al.*, 2013). Las condiciones de amplificación fue desnaturalización a 95°C por 45 segundos, hibridación a 60°C por 45 segundos y elongación a 72°C por 45 segundos (40 ciclos).

Para los primers se utilizó la herramienta bibliográfica BLAST de NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para verificar que las secuencias amplifiquen específicamente el gen de interés. Las secuencias de primers se presentan en la Tabla 7.

Tabla 7. Primers utilizados para la reacción de amplificación mediante RT-PCR

Gen	Primer FW	Primer RW	Tamaño del amplicón
<i>GUSB</i>	ACGCAGAAAATACGTGGTTGG	GCCGAGTGAAGATCCCCTTT	107
<i>BCL2</i>	CGACTTCGCCGAGATGTCCAGCCAG	ACTTGTGGCCCAGATAGGCACCCAG	389
<i>CD10</i>	GGGCTGGTGTGTCCTTTTGTA	AGTTCTGGACACGAAGTGCC	381
<i>BCL6</i>	GACATCATGGCCTATCGGGG	CGTGCCTCTTCTGGGATTGT	353
<i>MUM1</i>	GACGGAGCCGCTTACTTGA	AAATCCGCAGCTGAAGTTTCG	302

7.4.6 RT-qPCR

La determinación de los niveles de expresión de los genes se realizó mediante RT-qPCR utilizándose 300 ng de cDNA para los genes *BCL2*, *BCL6* y *MUM1* y 360 ng para el gen *CD10*, con TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied BioSystems, Life Technologies) y 0.35 μ L de sonda de hidrólisis en un volumen final de 20 μ L. El perfil térmico de amplificación fue desnaturalización a 95°C por 15 segundos, hibridación y elongación a 60°C por 1 minuto (40 ciclos). Se utilizó *GUSB* como gen de referencia y las líneas celulares HL-60, Reh y Jurkat como controles positivos. Los niveles de expresión se obtuvieron por el método $2^{-\Delta\Delta CT}$. Las secuencias de los primers y sondas se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Secuencias de primers y sondas para amplificación mediante RT-qPCR

Gen	Tipo de oligo	Secuencia	Tamaño del amplicón
<i>GUSB</i>	Primer FW	ACGCAGAAAATACGTGGTTGG	107 pb
	Primer RW	GCCGAGTGAAGATCCCCTTT	
	Sonda	CTCATTGGAATTTTGCCGAT	
<i>BCL2</i>	Primer FW	TGCCTGCTTTTAGGAGACCG	360 pb
	Primer RW	CCATTGCCTCTCCTCACGTT	
	Sonda	CTCCAGGTAGGCCCGTTTTTC	
<i>CD10</i>	Primer FW	GGGCTGGTGTGTCCTTTTGTA	381 pb
	Primer RW	AGTTCTGGACACGAAGTGCC	
	Sonda	TCGACTGTATGAAGGCGTGT	
<i>BCL6</i>	Primer FW	GACATCATGGCCTATCGGGG	353 pb
	Primer RW	CGTGCCTCTTCTGGGATTGT	
	Sonda	ACACCGCCAGCCTCTTATTC	
<i>MUM1</i>	Primer FW	CCATGACAACGCCTTACCCT	258 pb
	Primer RW	TTATGCTTGGCTCTGTGGGG	
	Sonda	CCCGTACCAATGTCCCATGA	

8. RESULTADOS

Se analizaron un total de 30 donadores sanos obtenidos del Banco de Sangre y 30 pacientes del Hospital General de México con consentimiento informado y diagnóstico histopatológico de LDCBG en distintos ciclos de quimioterapia R-CHOP.

8.1 Características clínico-patológicas de la población

De los 30 pacientes analizados, se encontró que el rango de edad fue de 20 a 84 años, con una media de 58.4. El 43.3% de los pacientes fueron mayores a 60 años. De esta población, 20 (66.7%) fueron mujeres y 10 (33.3%) hombres.

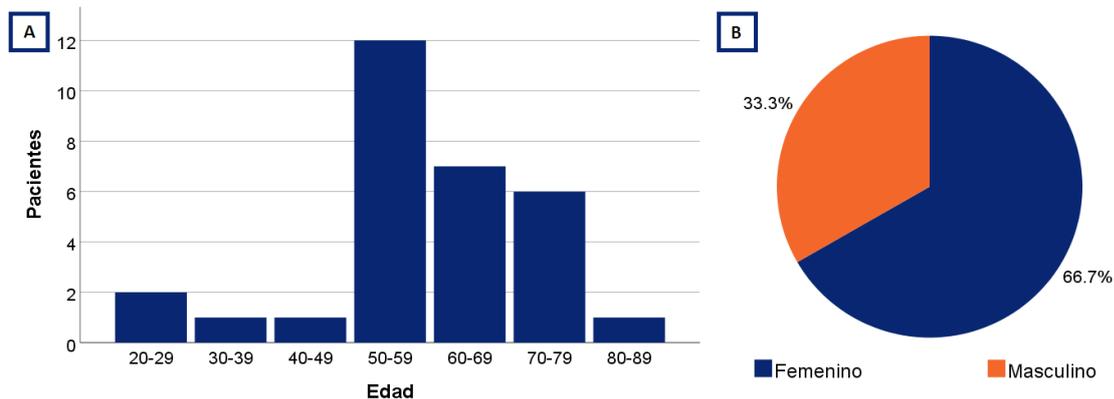


Gráfico 1. Características generales de la población.

A. Frecuencia por grupos de edad. B. Frecuencia de género en la población.

Los datos clínicos tales como cuenta leucocitaria y plaquetaria, cuantificación de hemoglobina y niveles de lactato deshidrogenasa (LDH) se obtuvieron del expediente clínico del paciente. Entre estos destacan los niveles de LDH, que fueron de 104 a 1218 U/L con una media de 351 U/L. El 6.7% (2/30) tuvieron niveles bajos, 46.7% (14/30) presentaron niveles normales y 46.7% (14/30) tuvieron niveles altos con respecto al intervalo de referencia (140-271 U/L).

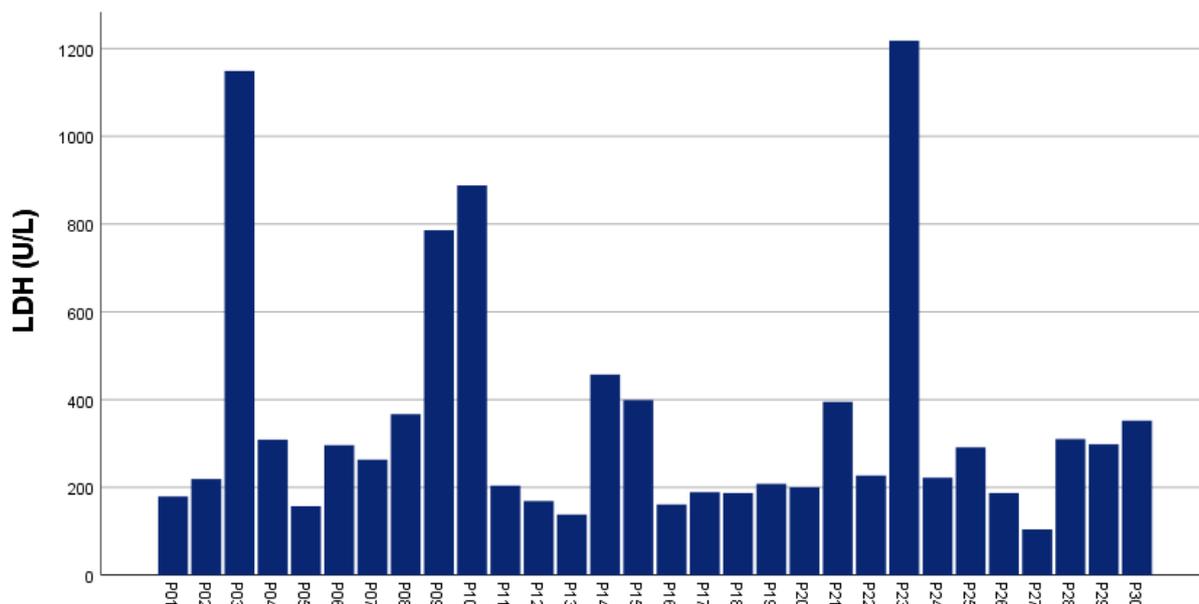


Gráfico 2. Lactato deshidrogenasa (LDH) (U/L) en pacientes con LDCBG.

De acuerdo con los resultados emitidos por el Departamento de Patología del Hospital General de México, el origen histológico de los pacientes fue de centro germinal en un 53.3% (16/30), célula B activada en 33.3% (10/30), mientras que 13.3% (4/30) no fueron reportados o no contaron con estudios inmunohistoquímicos suficientes para su clasificación.

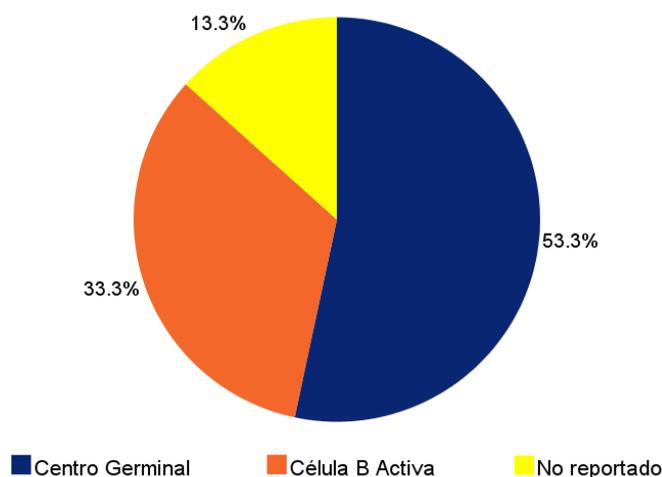


Gráfico 3. Origen histológico según inmunohistoquímica de pacientes con LDCBG.

El estadio clínico de los pacientes se clasificó de acuerdo con la estadificación Ann Arbor, encontrándose 7 pacientes (23.3%) en estadios temprano (I y II) y 23 (76.7%) en estadios clínicos avanzados (III y IV).

El cálculo del factor pronóstico R-IPI se realizó de acuerdo con el número de parámetros de riesgo que presentaron los pacientes, clasificándolos en 3 grupos: muy favorable, favorable o pobre. De acuerdo con los resultados, 4 pacientes (13.3%) tenían un pronóstico muy favorable, 9 (30%) favorable y 17 (56.7%) pobre.

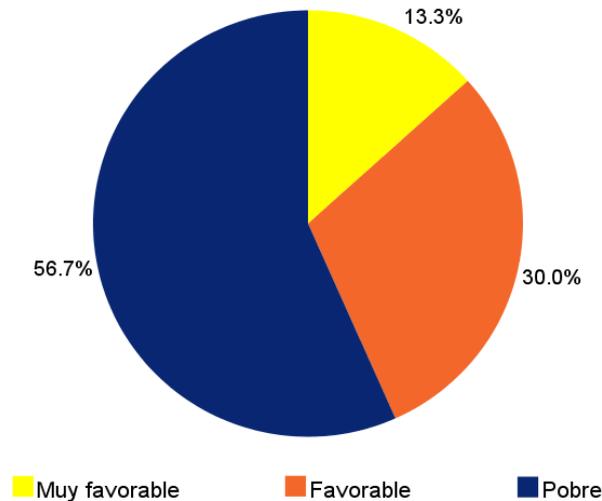


Gráfico 4. R-IPI en pacientes con LDCBG.

En la Tabla 9 se resumen las características clínico-patológicas de los pacientes analizados.

Tabla 9. Características clínico-patológicas de 30 pacientes con LDCBG

Parámetro (Intervalo de referencia)	Valores	N (%)
Edad	Media (rango)	58.4 (20-84)
	≤60 años	17 (56.7)
	>60 años	13 (43.3)
Género	Femenino	20 (66.7)
	Masculino	10 (33.3)
Leucocitos (F: 4.5- 11 x10 ³ /μL M: 4.5- 10.3 x10 ³ /μL)	Media (rango)	5.4 (2.2-9.3)
	Disminuido	11 (36.7)
	Normal	19 (63.3)
Hemoglobina (F: 11.7- 15.5 g/dL M: 13.6- 17.2 g/dL)	Media (rango)	12.6 (6.4-16.7)
	Disminuido	9 (30)
	Normal	20 (66.7)

	Elevado	1 (3.33)
Plaquetas (x10³/μL)	Valor de referencia	F: 159- 388, M: 156- 373
	Media (rango)	270.7 (48-485)
	Disminuida	5 (16.7)
	Normal	18 (60)
	Elevada	7 (23.3)
Lactato deshidrogenasa (LDH) (U/L)	Valores de referencia	140-271
	Media (rango)	351 (104-1218)
	Disminuido	2 (6.7)
	Normal	14 (46.7)
	Elevado	14 (46.7)
Origen histológico	Centro germinal	16 (53.3)
	Célula B Activada	10 (33.3)
	No reportado	4 (13.3)
ECOG	0-1	25 (83.3)
	≥2	5 (16.7)
Estadio clínico	I o II	7 (23.3)
	III o IV	23 (76.7)
Síntomas B	Presentes	21 (70)
	Ausentes	9 (30)
IPI	Bajo	7 (23.3)
	Intermedio bajo	6 (20)
	Intermedio alto	11 (36.7)
	Alto	6 (20)
R-IPI	Muy favorable	4 (13.3)
	Favorable	9 (30)
	Pobre	17 (56.7)

ECOG: Eastern Cooperative Oncology Group, IPI: Índice Pronóstico Internacional, R-IPI: Índice Pronóstico Internacional Revisado

De los 30 pacientes analizados, se recuperaron 71 muestras al diagnóstico y durante distintos ciclos de quimioterapia R-CHOP. Debido a que el estudio es transversal, el número de muestras recuperadas es variable por ciclo de quimioterapia. La distribución se presenta en la Tabla 10.

Tabla 10. Número de muestras de acuerdo con el ciclo de quimioterapia

Ciclo de quimioterapia	Número de muestras
<i>De novo</i>	7
1° ciclo	9
2° ciclo	12
3° ciclo	11
4° ciclo	9
5° ciclo	10
6° ciclo	13
Total	71

8.2 Determinación de la integridad del material genético extraído de sangre periférica de individuos sanos y pacientes con LDCBG

Se extrajo RNA de las muestras de sangre periférica de individuos sanos y pacientes y se determinó su concentración y pureza mediante espectrofotometría. Además, se confirmó su integridad por medio de electroforesis en gel de agarosa (Figura 10) en donde se observaron las bandas 18S y 28S, características del RNA ribosomal.



Figura 10. Electroforesis de RNA de muestras de individuos sanos y pacientes.

Se observan las bandas 18S y 28S del RNA ribosomal que corroboran la integridad. Carril 1-4:

Muestras de individuos sanos; carril 5-8: Muestras de pacientes con LDCBG.

Se realizó la síntesis de cDNA a partir del RNA extraído y se corroboró este proceso mediante la amplificación del gen constitutivo *GUSB* (107 pb). Los productos se corrieron en electroforesis en gel de agarosa al 1.5% (Figura 11).

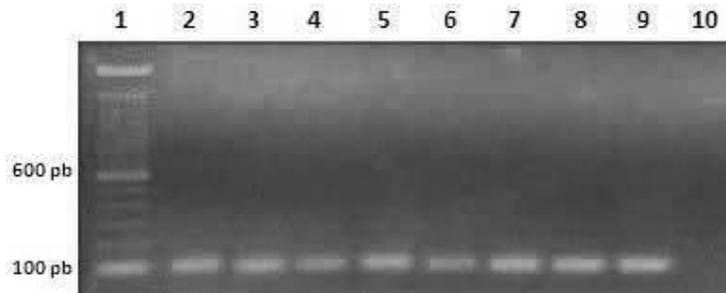


Figura 11. RT-qPCR del gen constitutivo *GUSB* en muestras de individuos sanos y pacientes.

Carril 1: Marcador de peso molecular (100 pb); carril 2-5: Muestras de individuos sanos; carril 6-9: Muestras de pacientes con LDCBG; carril 10: Control de reacción.

8.3 Estandarización de las condiciones de amplificación para RT-qPCR

Las condiciones de amplificación de los genes se determinaron mediante PCR en punto final (Figura 12), utilizando como controles positivos las líneas celulares HL60 para *BCL2*, Reh para *CD10* y *BCL6* y Jurkat para *MUM1*.

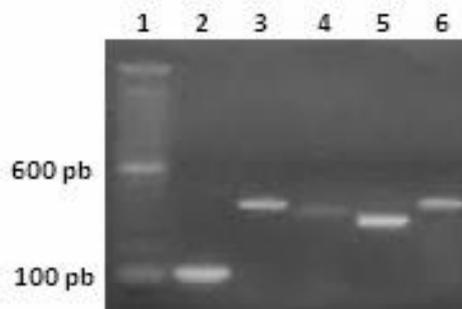


Figura 12. Amplificación de genes en líneas celulares.

Carril 1: Marcador de peso molecular (100 pb); carril 2: *GUSB* (107 pb); carril 3: *CD10* (381 pb); carril 4: *BCL6* (353 pb); carril 5: *MUM1* (302 pb); carril 6: *BCL2* (389 pb).

Al estandarizar las condiciones de amplificación para los genes en RT-qPCR (40 ciclos de desnaturalización a 95°C por 15 segundos, hibridación y elongación a 60°C por 1 minuto) se obtuvieron los plots de amplificación que se presentan en la Figura 13.

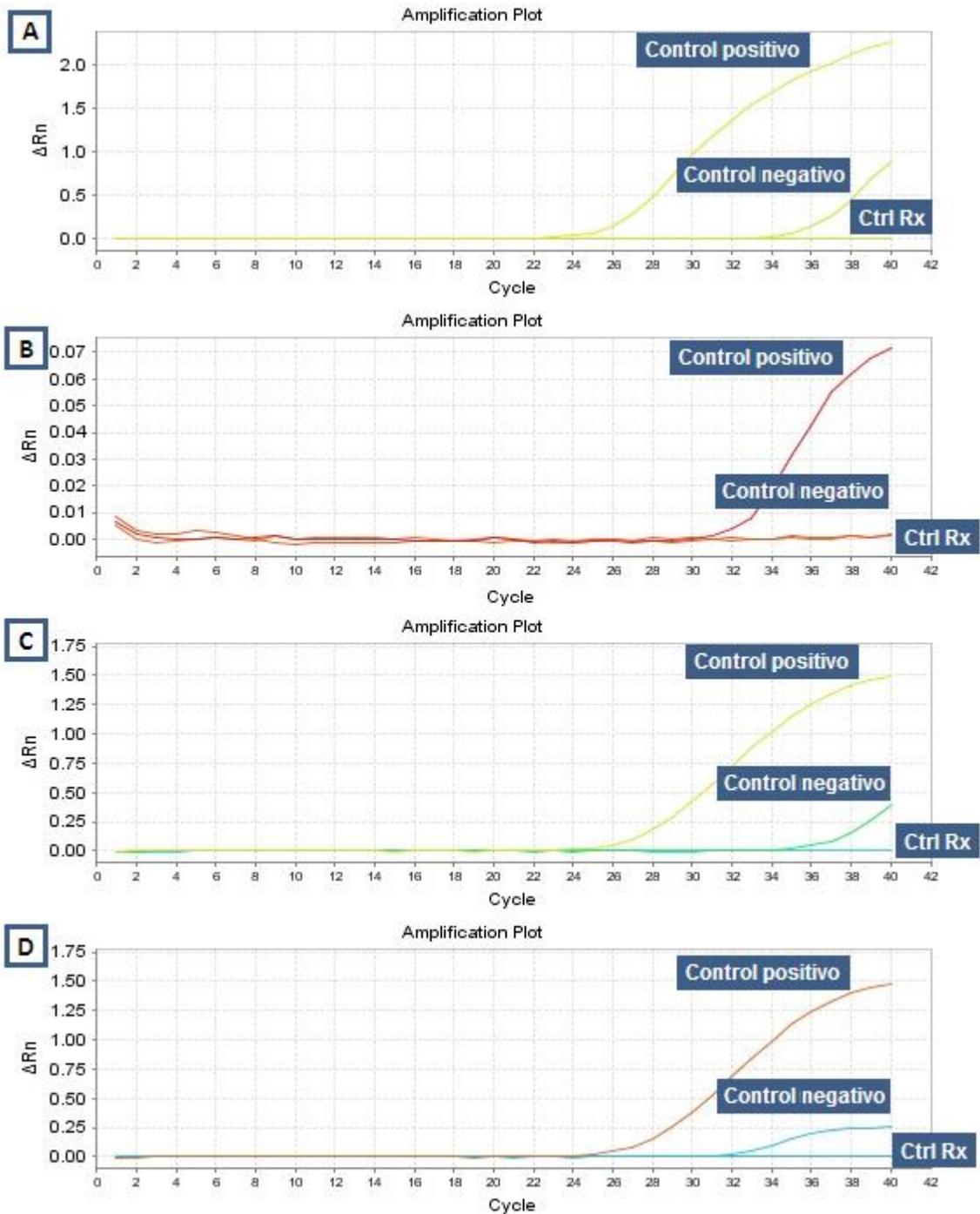


Figura 13. Plots de amplificación de los genes en líneas celulares.

Las líneas celulares (HL-60 para A. *BCL2*, Reh para B. *CD10* y C. *BCL6*, Jurkat para D: *MUM1*) se utilizaron como controles positivos mostrando amplificación. El control negativo tuvo poca o nula amplificación para cada gen. El control de reacción no tuvo amplificación, por lo que se estandarizaron las condiciones de amplificación empleadas.

8.4 Expresión de los genes en tumor primario y sangre periférica

Debido a que el objetivo de esta tesis es determinar los niveles de sobreexpresión de los genes *BCL2*, *CD10*, *BCL6* y *MUM1* en CTCs obtenidas de sangre periférica fue necesario comprobar que el perfil de expresión de las CTCs refleja la expresión de genes en el tumor primario. Para ello, se realizó la amplificación del panel de genes en una muestra de tumor primario y en CTCs obtenidas de sangre periférica de un paciente con diagnóstico de LDCBG subtipo CBA. En la Figura 14 se presenta como ejemplo la expresión de *BCL2* en el tumor primario y sangre periférica, y la expresión de individuos sanos. Al observar esto se confirmó que la determinación de genes en CTCs permite evidenciar el comportamiento de la expresión en el tumor primario.

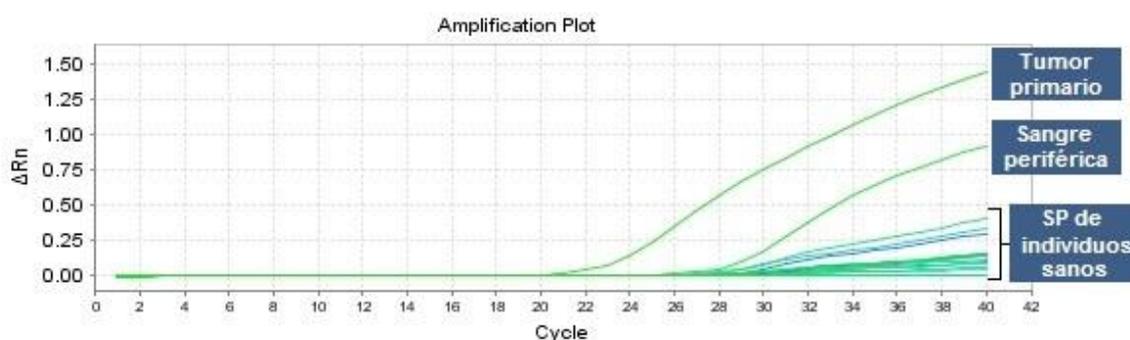


Figura 14. Plot de amplificación de *BCL2* en tumor primario y sangre periférica de un paciente con LDCBG subtipo CBA.

1. Tumor primario de paciente con LDCBG CBA,
2. Sangre periférica de paciente con LDCBG CBA,
3. Sangre periférica de individuos sanos.

8.5 Expresión de los genes *BCL2*, *CD10*, *BCL6* y *MUM1* en individuos sanos y en CTCs de pacientes con LDCBG

Se determinaron por medio de RT-qPCR los niveles de expresión de los genes en individuos sanos y en pacientes, estableciéndose el rango de expresión basal de los genes como referencia para diferenciar a los pacientes que presenten expresión normal o sobreexpresión.

8.5.1 Expresión de *BCL2* en individuos sanos y en CTCs de pacientes con LDCBG

A partir de los niveles de expresión de *BCL2* de 30 individuos sanos se calculó el tercer cuartil, que fue de 0.44 (Gráfico 5, línea roja). Este fue el valor límite superior para considerar la expresión normal del gen.

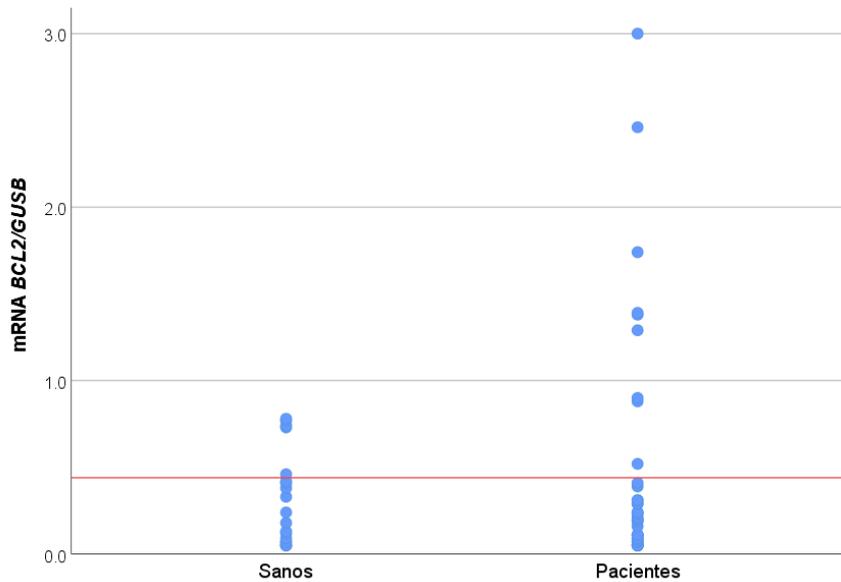


Gráfico 5. Comparación de los niveles de expresión de *BCL2* en individuos sanos y en CTCs de pacientes con LDCBG.

En el 46.7% (33/71) de las CTCs de pacientes no se encontró expresión de dicho gen, mientras que el 40.8% (29/71) presentó una expresión normal (0.05-0.41) y 12.7% (9/71) presentó sobreexpresión (Gráfico 6).

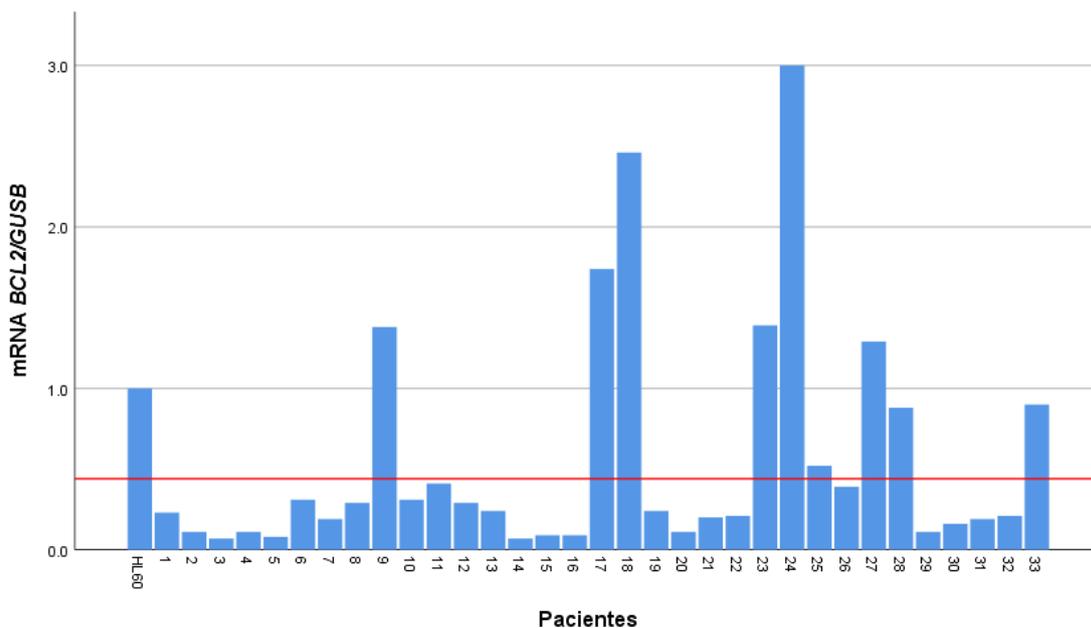


Gráfico 6. Niveles de expresión relativa de *BCL2* en CTCs de pacientes por muestra.

Se encontró que la frecuencia de sobreexpresión de *BCL2* en CTCs fue de 12.7% (9/71), lo cual corresponde al 20% (6/30) de los pacientes. La distribución de acuerdo con el ciclo de tratamiento se presenta en la Tabla 11. Cabe destacar que se observó que en los

primeros ciclos de quimioterapia la frecuencia de la sobreexpresión fue mayor que en los últimos ciclos.

Tabla 11. Expresión de *BCL2* en CTCs de pacientes de acuerdo con el ciclo de quimioterapia.

Expresión\Ciclo	<i>De novo</i>	1°	2°	3°	4°	5°	6°
Total (n=71)	7 (%)	9(%)	12 (%)	11 (%)	9 (%)	10 (%)	13 (%)
Ausente	1 (14.2)	4 (44.4)	3 (25)	5 (45.5)	5 (55.6)	5 (50)	9 (69.2)
Normal	3 (42.9)	4 (44.4)	6 (50)	6 (54.5)	4 (44.4)	5 (50)	2 (15.4)
Sobreexpresado	3 (42.9)	1 (11.2)	3 (25)	0	0	0	2 (15.4)

8.5.2 Expresión de *CD10* en individuos sanos y en CTCs de pacientes con LDCBG

Al determinar los niveles de expresión de *CD10* se confirmó que este marcador de inmadurez celular no se encuentra en células maduras de la circulación sanguínea de individuos sanos. No se encontró expresión de dicho gen en el 94.4% de las CTCs de pacientes (67/71), mientras que se expresó en el 5.6% (4/71) (Gráfico 7).

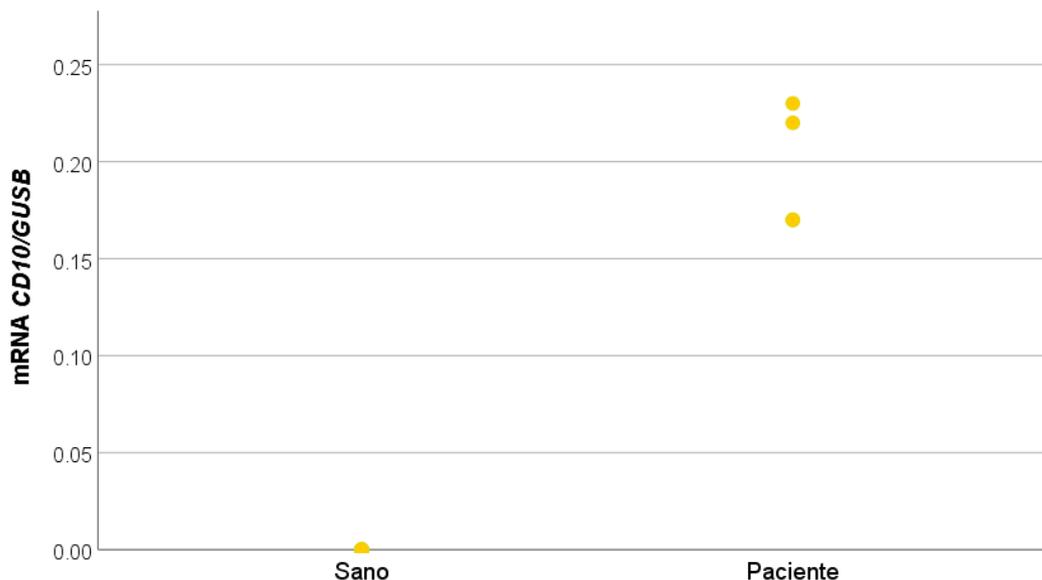


Gráfico 7. Comparación de los niveles de expresión de *CD10* en individuos sanos y en CTCs de pacientes con LDCBG.

La frecuencia de la expresión de *CD10* fue de 5.6% (4/71) en las muestras analizadas, lo que equivale a 13.3% (4/30) de los pacientes. La distribución de acuerdo con el ciclo de tratamiento se presenta en la Tabla 12. En cuanto a la frecuencia de expresión, no se encontró diferencia entre los ciclos de quimioterapia.

Tabla 12. Expresión de *CD10* en CTCs de pacientes de acuerdo con el ciclo de quimioterapia.

Expresión\Ciclo	<i>De novo</i>	1	2°	3°	4°	5°	6°
Total (n=71)	7 (%)	9(%)	12 (%)	11 (%)	9 (%)	10 (%)	13 (%)
Ausente	7 (100)	8 (88.9)	12 (100)	10 (90.9)	9 (100)	8 (80)	13 (100)
Expresión	0	1 (11.1)	0	1 (9.1)	0	2 (20)	0

8.5.3 Expresión de *BCL6* en individuos sanos y en CTCs de pacientes con LDCBG

Se calculó que el límite superior de la expresión normal fue de 0.59 a partir de la determinación de los niveles de expresión de 30 individuos sanos (Gráfico 8, línea roja).

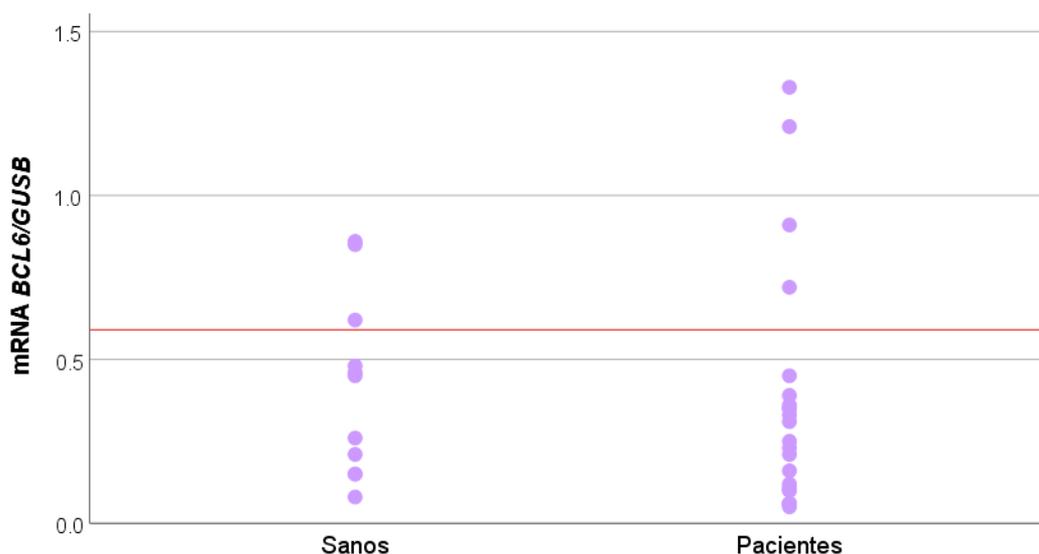


Gráfico 8. Comparación de los niveles de expresión en individuos sanos y en CTCs de pacientes con LDCBG.

De acuerdo con el valor del tercer cuartil se determinó que en el 66.2% (47/71) de las CTCs de pacientes no hubo expresión, 28.2% (20/71) tuvieron expresión normal (0.05-0.45) y 5.6% (4/71) presentaron sobreexpresión del gen (Gráfico 9).

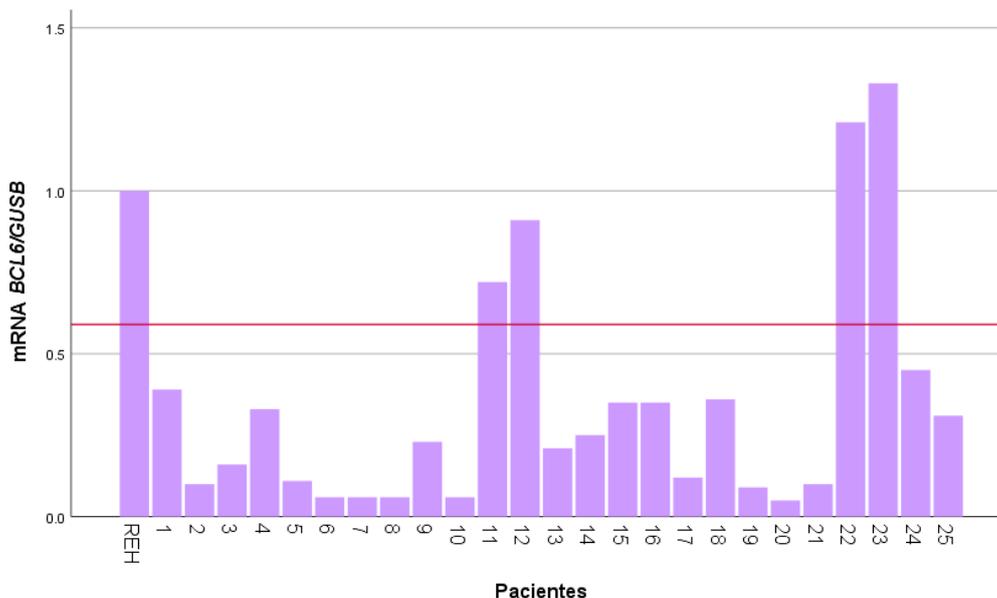


Gráfico 9. Niveles de expresión relativa de *BCL6* en CTCs de pacientes por muestra.

Se encontró que *BCL6* estaba sobreexpresado en 5.6% (4/71) de las CTCs de pacientes, lo cual corresponde al 13.3%. La distribución de acuerdo con el ciclo de quimioterapia se presenta en la Tabla 13. Es importante mencionar que, al contrario de *BCL2*, la sobreexpresión fue más frecuente en los últimos ciclos de quimioterapia.

Tabla 13. Expresión de *BCL6* en CTCs de pacientes de acuerdo con el ciclo de quimioterapia.

Expresión\Ciclo	<i>De novo</i>	1°	2°	3°	4°	5°	6°
Total (n=71)	7 (%)	9(%)	12 (%)	11 (%)	9 (%)	10 (%)	13 (%)
Ausente	6 (85.7)	7 (77.8)	7 (58.3)	6 (54.5)	7 (77.8)	4 (40)	9 (69.2)
Normal	1 (14.3)	2 (22.2)	5 (41.7)	4 (36.4)	2 (22.2)	4 (40)	3 (23.1)
Sobreexpresado	0	0	0	1 (9.1)	0	2 (20)	1 (7.7)

8.5.4 Expresión de *MUM1* en individuos sanos y en CTCs de pacientes con LDCBG

Se determinó la expresión basal de *MUM1* en 30 individuos sanos (Gráfico 10, línea roja), lo cual permitió realizar el cálculo del tercer cuartil, que fue de 0.45. Este valor se consideró como el límite superior de la expresión normal.

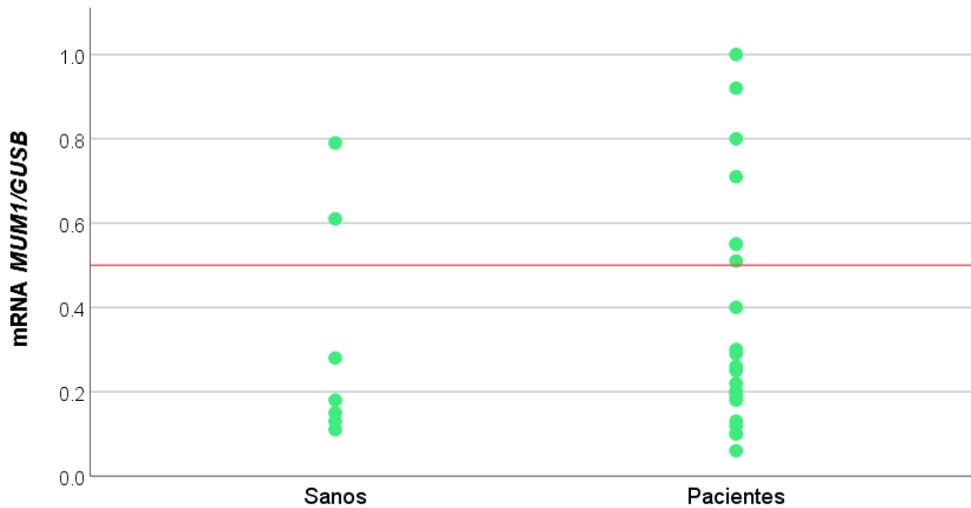


Gráfico 10. Comparación de los niveles de expresión de *MUM1* en individuos sanos y en CTCs de pacientes con LDCBG.

A partir de este cálculo, no se encontró expresión de *MUM1* en el 69% (49/71) de las CTCs, 21.1% (15/71) tuvieron expresión normal y 9.9% (7/71) tuvieron sobreexpresión (Gráfico 11).

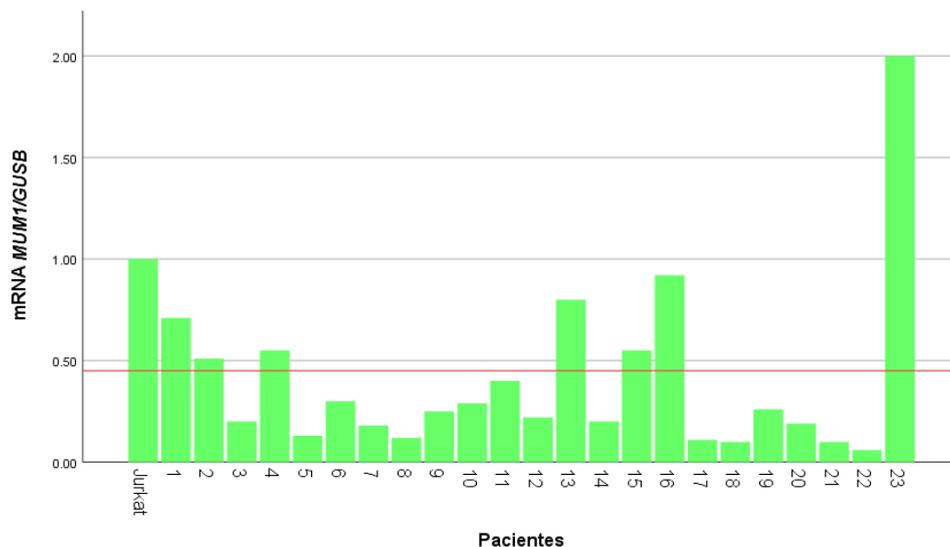


Gráfico 11. Niveles de expresión relativa de *MUM1* en CTCs de pacientes por muestra.

Se encontraron niveles de sobreexpresión de *MUM1* en el 9.9% (7/71) de las CTCs, lo cual corresponde al 16.7% (5/30) de los pacientes. La distribución de acuerdo con el ciclo de quimioterapia se presenta en la Tabla 14. Se observó, además, que la frecuencia de sobreexpresión fue constante durante todos los ciclos de quimioterapia.

Tabla 14. Expresión de *MUM1* en CTCs de pacientes de acuerdo con el ciclo de quimioterapia.

	<i>De novo</i>	1°	2°	3°	4°	5°	6°
Total (n=71)	7 (%)	9(%)	12 (%)	11 (%)	9 (%)	10 (%)	13 (%)
Ausente	5 (71.4)	8 (88.9)	5 (41.7)	7 (63.6)	7 (77.8)	5 (50)	11 (84.6)
Normal	1 (14.3)	0	6 (50)	3 (27.3)	2 (22.2)	3(30)	1 (7.7)
Sobreexpresado	1 (14.3)	1 (11.1)	1 (8.3)	1 (9.1)	0	2 (20)	1 (7.7)

8.6 Subclasificación molecular del LDCBG de acuerdo con los resultados obtenidos por RT-qPCR

Se realizó la subclasificación del LDCBG de acuerdo con los niveles de expresión obtenidos por RT-qPCR, considerando la sobreexpresión de los genes *CD10*, *BCL6* y *MUM1* como un resultado positivo para seguir el Algoritmo de Hans. De esta manera, los pacientes se clasificaron en Centro Germinal o Célula B Activada. El resultado obtenido por este método se comparó con el reportado por el Departamento de Patología del Hospital General de México. De acuerdo con los niveles de expresión de los genes, fue posible clasificar 25 pacientes de los 30 analizados. En la Tabla 15 se muestra dicha comparación, se resaltan de color verde aquellos resultados que concuerdan con la inmunohistoquímica y con color rojo los que no.

Tabla 15. Comparación del subtipo molecular obtenido por inmunohistoquímica (IHQ) y por RT-qPCR utilizando el Algoritmo de Hans

Paciente	Resultado		Paciente	Resultado	
	RT-qPCR	IHQ		RT-qPCR	IHQ
1	CG	CG	18	CBA	CG
2	CBA	CG	20	CBA	CBA
3	CG	CG	21	CG	CG

5	CG	CBA	22	CG	ND
6	CBA	CG	23	CG	CG
7	CG	CG	24	CG	CG
9	CG	CG	25	CG	CG
10	CBA	CBA	26	CBA	CG
12	CBA	CBA	27	CBA	CG
13	CG	CBA	28	CBA	CBA
15	CBA	CG	29	CG	CG
16	CBA	ND	30	CG	CG
17	CG	CBA			

IHQ: Inmunohistoquímica, CG: Centro Germinal, CBA: Célula B Activada, ND: No determinado.

La frecuencia de los subtipos moleculares obtenidos por inmunohistoquímica y RT-qPCR se presentan en la Tabla 16.

Tabla 16. Comparación de la frecuencia de los subtipos CG y CBA por métodos moleculares e inmunohistoquímicos

Subtipo molecular	Frecuencia n (%)	
	RT-qPCR	Inmunohistoquímica
Centro Germinal	14 (56)	16 (64)
Célula B Activada	11 (44)	7 (28)

Se encontró que el 56% (14/25) de los resultados obtenidos por RT-qPCR mediante el Algoritmo de Hans concuerdan con los emitidos por inmunohistoquímica. Se encontró una mayor concordancia en el subtipo CG (64.3%) que en el subtipo CBA (36.4%).

8.7 Correlación de la sobreexpresión de los genes y características clínico-patológicas de pacientes con LDCBG

Las características clínico-patológicas que se evaluaron fueron edad, género, cuenta leucocitaria, plaquetaria, cuantificación de hemoglobina y LDH, origen histológico de acuerdo con la clasificación por inmunohistoquímica, estado funcional del paciente según

la escala ECOG, estadio clínico Ann Arbor, presencia o ausencia de síntomas B, IPI, R-IPI, PET final de tratamiento y respuesta post-quimioterapia.

El software utilizado fue IBM SPSS Statistics 25 (*Statistical Package for Social Science*, SPSS Inc. Chicago, USA).

Tabla 17. Correlación entre el subtipo molecular determinado por la sobreexpresión de los genes *BCL2*, *CD10*, *BCL6* y *MUM1* y los parámetros clínico-patológicos

Subtipo molecular Parámetros clínico-patológicos		Centro Germinal	Célula B Activada
Edad	≤60 años	10	4
	>60 años	4	7
Género	Femenino	9	8
	Masculino	5	3
LDH	Normal	7	7
	Elevado	7	4
Origen histológico por IHQ	Centro Germinal	10	6
	Célula B Activada	3	4
	No determinado	1	1
Sobreexpresión <i>BCL2</i>	Sí	3	2
	No	11	9
ECOG	0-1	13	7
	≥2	1	4
Estadio Clínico	I-II	5	2
	III-IV	9	9
Síntomas B	Presentes	12	6
	Ausentes	2	5
IPI	Bajo - Intermedio bajo	7	5
	Intermedio alto - Alto	7	6
R-IPI	Pobre	7	6
	Favorable	4	4
	Muy favorable	3	1
PET final	Respuesta completa	11	7
	Progresión	3	4
Respuesta post- quimioterapia	En remisión	12	8
	Refractario	2	3
Estado general	Vivo	14	9
	Muerto	0	2

9. DISCUSIÓN

La subclasificación del LDCBG de acuerdo con su célula de origen (Célula B Activada o Centro Germinal) es de gran utilidad pronóstica y brinda una herramienta para terapias dirigidas que permitan mejorar el resultado de esta enfermedad (Jaffe *et al.*, 2017 & Coutinho *et al.*, 2013). Ejemplos de dichas terapias son los inhibidores de proteosoma (bortezomib), inmunomoduladores (lenalidomida), inhibidores de la proteína BTK (ibrutinib), inhibidores de BCL2 (venetoclax), entre otros, que han demostrado acción sinérgica con la terapia R-CHOP (Jo *et al.*, 2019; Castellino *et al.*, 2018; Younes *et al.*, 2019; Goy *et al.*, 2019 & Morschhauser *et al.*, 2018).

Originalmente, la subclasificación de esta neoplasia se realizó utilizando el perfil de expresión génica a partir de tejidos FFPE (*Formalin-Fixed Paraffin-Embedded*, fijados en formalina embebidos en parafina) y un algoritmo predictor bayesiano (Rimsza *et al.*, 2011). Sin embargo, la imposibilidad de su implementación rutinaria fue el principal factor limitante para el uso extendido de esta técnica. Es por esto que se desarrollaron algoritmos inmunohistoquímicos que buscan emular los resultados obtenidos con los perfiles de expresión génica (GEP), utilizando la expresión individual de marcadores relacionados con los subtipos Centro Germinal y Célula B Activada. El más aceptado y utilizado a nivel mundial es el algoritmo de Hans debido a la concordancia que presenta con respecto al GEP (71% en subtipo CG y 88% en CBA) (Hans *et al.*, 2004). Sin embargo, los algoritmos inmunohistoquímicos presentan diversas desventajas, entre las que se encuentran la baja sensibilidad del método y el largo tiempo que toma emitir un resultado, además de representar un método invasivo para los pacientes (Coutinho *et al.*, 2013 & Hwang *et al.*, 2014).

Por este motivo, se han propuesto alternativas no invasivas para el diagnóstico y el monitoreo en tiempo real de la evolución del tumor y la respuesta terapéutica. Una de ellas es la detección y caracterización de CTCs, las cuales ofrecen un complemento al diagnóstico que permite mejorar la detección temprana y las decisiones de tratamiento apropiadas (Jia *et al.*, 2017 & Masuda *et al.*, 2016).

La utilidad del estudio de CTCs está bien establecida en diversos cánceres metastásicos, como de mama, próstata, colorrectal, pulmón, hepatocelular, vejiga, ovarios, entre otros; donde se ha encontrado que tienen potencial diagnóstico, pronóstico y en el tratamiento (Podtar & Lotey, 2015). Sin embargo, los estudios en linfoma, específicamente en LDCBG,

son escasos. Destaca el estudio realizado por nuestro equipo de trabajo en que se determinó el impacto clínico de un panel de biomarcadores metastásicos en CTCs derivadas de pacientes con LDCBG (Cerón, 2019).⁵⁸

En este estudio se realizó la subclasificación del LDCBG de acuerdo con los niveles de expresión de *CD10*, *BCL6* y *MUM1* en 30 pacientes. La media de edad que presentó la población fue de 58 años, la cual es ligeramente menor a la reportada por la OMS, que la ubica en la séptima década de vida (Swerdlow *et al.*, 2017). La OMS también reporta que es más común en hombres que en mujeres (Swerdlow *et al.*, 2017), sin embargo, entre los pacientes analizados se encontró un marcado predominio del sexo femenino (66.7%). Esto se atribuye a que la mayor participación en el estudio fue de mujeres, a pesar de que en el Hospital General de México se reporte una mayor frecuencia de enfermedades onco-hematológicas en hombres (Berrios, 2007). Se encontró que el 46.7% de los pacientes presentaron valores elevados de LDH, similar a lo que reportaron Hong *et al.* (2013), quienes encontraron un incremento en los valores de LDH en un 43.4% de pacientes durante y después de la quimioterapia con tratamiento R-CHOP. En cuanto a la célula de origen se encontró el subtipo del CG con una frecuencia del 53.3%, el de CBA con frecuencia del 33.3% y el 13.3% no reportados. Una proporción similar fue reportada por Girgis y colaboradores en un estudio de 285 pacientes, cuyas frecuencias para los subtipos CG y CBA fueron de 49.1% y 32.9% respectivamente, mientras que el 18% de los pacientes fueron indeterminados mediante inmunohistoquímica utilizando el Algoritmo de Hans (Girgis *et al.*, 2018). En el estado funcional, el 16.7% de los pacientes presentaron valores mayores a 1 de acuerdo con la escala ECOG, lo que concuerda con los datos reportados por Coutinho *et al.* (2013) quienes encontraron que la mayoría de los pacientes tenían ECOG bajo, teniendo únicamente el 16% valores por arriba de 1 en la escala. En la población de estudio se encontró que el 76.7% de los pacientes debutó en estadios clínicos avanzados (III y IV), proporción similar a la reportada por Zhong *et al.*, quienes encontraron a la mayoría de los pacientes al diagnóstico en estadios II y IV de la escala Ann Arbor-Cotswold (Zhong *et al.*, 2017). Tras la administración de 6 ciclos de quimioterapia bajo el esquema R-CHOP se encontró que el 60% de los pacientes alcanzaron la remisión, 20% fueron refractarios al tratamiento y el 20% se encontraba en vigilancia. Los datos de refractariedad concuerdan con lo reportado por Coiffier y Sarkozy (Coiffier & Sarkozy, 2016).

Con la finalidad de comprobar que el perfil de expresión de las CTCs refleja la expresión de genes en el tumor primario, se realizó la determinación de los niveles de expresión de *BCL2*, *CD10*, *BCL6*, y *MUM1* en una biopsia de tumor primario y en CTCs de un solo paciente con diagnóstico de LDCBG subtipo CBA. En ambas muestras biológicas se encontró

sobreexpresión de los genes *BCL2*, *BCL6* y *MUM1* por RT-qPCR, lo cual concuerda con los resultados de inmunohistoquímica emitidos por el Departamento de Patología del Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga”. Además, fue posible detectar sobreexpresión de los genes en CTCs en muestras de distintos ciclos de tratamiento, lo cual sugiere la utilidad de esta metodología para el seguimiento de la enfermedad. Existen pocos estudios en que se compare la expresión de genes en tumor primario y en CTCs. Lohr y colaboradores encontraron por medio de citometría de flujo que las CTCs de mieloma múltiple proporcionan la misma información genética que las células obtenidas por biopsia de médula ósea, e incluso revelan mutaciones con mayor sensibilidad en algunos casos (Lohr *et al.*, 2016).

Con respecto a la expresión individual de los genes, se encontró sobreexpresión de genes con valor pronóstico (*BCL2*), así como de los genes utilizados en el Algoritmo de Hans para la subclasificación del LDCBG (*CD10*, *BCL6* y *MUM1*) en las muestras de los pacientes tras la determinación del rango de expresión basal en individuos sanos.

BCL2 es un factor antiapoptótico importante en el desarrollo y diferenciación de la célula B (Schuetz *et al.*, 2012). La sobreexpresión de *BCL2* se considera como un factor de mal pronóstico en el LDCBG, debido a la ventaja de supervivencia que proporciona a las células B, y al papel crítico que desempeña en la resistencia a la quimioterapia (Reed, 1997). Si bien la detección de *BCL2* en CTCs no se ha estudiado en neoplasias hematológicas, en cáncer de mama se ha encontrado correlación con la disminución de la apoptosis y en cáncer de pulmón de células pequeñas se propone su uso como biomarcador asociado con la eficacia del tratamiento y el desenlace clínico de los pacientes (Smerage *et al.*, 2013; Smerage *et al.*, 2008 & Messaritakis *et al.*, 2018). En el presente trabajo se encontró una frecuencia de la sobreexpresión de *BCL2* en CTCs del 20% (6/30). La frecuencia de sobreexpresión fue mayor en ciclos tempranos del tratamiento y que redujo en ciclos avanzados debido al efecto de la quimioterapia, encontrándose que el 66.7% (4/6) de los pacientes alcanzaron remisión. Esto se observó en el caso de un paciente que debutó con sobreexpresión de este gen y disminuyó hasta expresar en niveles normales en su tercer ciclo de quimioterapia, alcanzando remisión con una excelente respuesta clínica. Por otro lado, cabe destacar el caso de un paciente con diagnóstico de LDCBG subtipo CBA cuya muestra presentó la sobreexpresión más alta de *BCL2* a pesar de haber sido recuperada tras 6 ciclos de quimioterapia. Este paciente tuvo un desenlace clínico desfavorable, falleciendo 4 meses después de terminar su tratamiento. Esto concuerda con lo reportado por Iqbal y colaboradores (2006), quienes encontraron que los pacientes con LDCBG

subtipo CBA con niveles altos de *BCL2* tenían una SG significativamente menor con respecto a los que expresaron en niveles normales.

Se ha encontrado que *CD10*, marcador de inmadurez de células B (Mishra *et al.*, 2016), puede indicar un buen pronóstico en carcinomas de cuello uterino (Terauchi *et al.*, 2005) y de pulmón (Tokuhara *et al.* 2001), mientras que es de mal pronóstico en varios tumores sólidos asociados con la progresión de la enfermedad y el potencial metastásico, tales como tumores gástricos, pancreáticos y colorrectales (Deshamps *et al.*, 2006). Su expresión en LDCBG es controvertida. Algunos autores encontraron que es un marcador de buen pronóstico, mientras que otros afirman que no tiene un valor predictivo en cuanto a SG o SLP (Ohshima *et al.*, 2001 & Lu *et al.*, 2016). En la literatura se reporta que su expresión en sangre periférica de individuos sanos está restringida a neutrófilos maduros y a etapas linfoides B tempranas (Marini *et al.*, 2017; Elghetany, 2002; Shipp & Look, 1993). Esto se refleja en nuestros resultados, en donde no se encontró expresión de *CD10* en sanos, lo que se atribuye al enriquecimiento de células mononucleares y CTCs mediante gradiente de densidad. Al eliminar las células polimorfonucleares, tales como neutrófilos segmentados, no se detectó la expresión de *CD10* de éstos. Adicionalmente, se sabe que *CD10* aparece por primera vez en las células pro-B y se pierde durante la maduración a las células B vírgenes, que son etapas que no se encuentran en sangre periférica en condiciones normales (Uherova *et al.*, 2001). Nuestros resultados concuerdan con lo reportado por Baseggio y colaboradores (2011), quienes encontraron que no hay expresión de *CD10* en sangre periférica de individuos sanos en un estudio realizado mediante citometría de flujo. En el presente estudio, se encontró una frecuencia de expresión de *CD10* en CTCs en el 13.3% (4/30) de los pacientes. En distintas neoplasias, tales como el carcinoma de células renales (Kang *et al.*, 2018) y el melanoma metastásico (Long *et al.*, 2016) se ha reportado una baja expresión de *CD10* en CTCs. No hay estudios que reporten la expresión en LDCBG, sin embargo, en este trabajo se pudo comprobar que la determinación de *CD10* mediante RT-qPCR permite la detección en CTCs en distintos tiempos de tratamiento debido a la sensibilidad del método.

BCL6 es un gen que tiene un gran impacto sobre el centro germinal, regulando los genes y las rutas clave implicados en el ciclo celular, la diferenciación a células plasmáticas y la apoptosis, así como en la inflamación (Wagner *et al.*, 2011; Basso & Dalla-Favera, 2012). Se ha encontrado que *BCL6* está implicado en expansión de tumores sólidos y hematológicos, tales como cáncer de mama, cáncer de pulmón de células no pequeñas, leucemia linfoblástica aguda B, leucemia mieloide crónica; y es especialmente frecuente en LDCBG (Cardenas *et al.*, 2016 & Iglesias, 2017). En el presente trabajo se encontró

sobreexpresión de *BCL6* en el 13.3% (4/30) de los pacientes analizados. Los pacientes que presentaron sobreexpresión se encontraban en ciclos avanzados del tratamiento, y al no contar con muestras de ciclos anteriores de estos mismos pacientes no podemos asegurar si tenían o no sobreexpresión desde su diagnóstico. Sin embargo, se pudo observar que el 50% de los pacientes que presentaron sobreexpresión (2/4) tuvieron una respuesta post-quimioterapia poco favorable, ya que uno de ellos no alcanzó la remisión de su padecimiento y otro falleció. Esto concuerda con los resultados reportados por Cerón (2019), quien encontró asociación entre la sobreexpresión y el desenlace clínico de los pacientes. La determinación de *BCL6* en CTCs se ha propuesto como un biomarcador de pronóstico desfavorable en LDCBG, resaltando la utilidad de su detección en la biopsia líquida.

El oncogén del mieloma múltiple (*MUM1*) se considera un regulador clave en la diferenciación y maduración de células linfoides, mieloides y dendríticas (Gualco *et al.*, 2010). La expresión de *MUM1* se asocia con un pronóstico pobre en mieloma múltiple¹²⁰, linfoma folicular (Xerri *et al.*, 2014) y linfoma de Burkitt (Satou *et al.*, 2017), entre otros. En el LDCBG, el subtipo CBA se caracteriza por la alta expresión de *MUM1* dada por la activación de la vía NF- κ B, que puede bloquear la apoptosis inducida por la quimioterapia, lo cual contribuye con su mal pronóstico (Duarte, 2014). En la literatura, no se ha reportado su expresión en CTCs derivadas de LDCBG, sin embargo, Lohr y colaboradores (2016) detectaron mutaciones de este gen en CTCs de pacientes con mieloma múltiple con baja carga tumoral. En el presente estudio se encontró sobreexpresión de *MUM1* en el 16.7% de los pacientes analizados (5/30). En estos pacientes, destaca que el 40% (2/5) de aquellos que presentaron sobreexpresión correspondían al subtipo de CG, y además tuvieron sobreexpresión del gen *CD10*. A pesar de que la expresión de *MUM1* se asocia al LDCBG subtipo CBA, se sabe que algunas células de CG que están por diferenciarse a células plasmáticas expresan *MUM1* con pérdida de la expresión de *BCL6* y *KI67* (Shaffer *et al.*, 2009). Esto podría explicar la expresión simultánea de *CD10* y *MUM1* en pacientes con subtipo CG.

Una vez determinados los niveles de expresión de los genes que constituyen este panel se realizó la subclasificación del LDCBG de acuerdo con el Algoritmo de Hans. La subclasificación de esta neoplasia según la célula de origen es uno de los factores pronósticos con más impacto y un biomarcador potencial para futuras terapias (Wilson *et al.*, 2015 & Nowarowski *et al.*, 2015) sin embargo, su determinación precisa continúa siendo un desafío en el área clínica. Actualmente los enfoques existentes dependen de la biopsia de tumor primario, mientras que otros menos invasivos como la biopsia líquida continúan

en estudio. Scherer y colaboradores (2016) realizaron un perfil personalizado de cáncer mediante secuenciación profunda (CAPP- Seq) en ctDNA de pacientes con LDCBG, encontrando una concordancia del 88% entre este método y el perfil de expresión génica. En el presente estudio, utilizando la expresión en CTCs de *CD10*, *BCL6* y *MUM1* fue posible subclasificar a 25 de los 30 pacientes analizados. De éstos, se determinó que el 56% (14/25) pertenecieron al subtipo CG y el 44% (11/25) al subtipo CBA. Los resultados se compararon con los reportados por el Departamento de Patología (64% subtipo CG, 28% CBA y 8% no determinados), encontrándose que el 56% (14/25) de los resultados obtenidos por RT-qPCR mediante el Algoritmo de Hans concuerdan con los emitidos por inmunohistoquímica. Asimismo, fue posible determinar el subtipo molecular mediante RT-qPCR de aquellos pacientes que no contaban con estudios inmunohistoquímicos suficientes para su clasificación (2/25). En estudios realizados en CTCs en mieloma múltiple se determinó que el aislamiento y caracterización de éstas provee la misma información genética que la biopsia de tejido, e incluso puede revelar alteraciones con mayor sensibilidad que las pruebas inmunohistoquímicas en algunos casos (Lohr *et al.*, 2016). Esto permite sugerir que la determinación de los niveles de expresión de los genes *CD10*, *BCL6* y *MUM1* en CTCs tiene una mayor sensibilidad que las técnicas inmunohistoquímicas en tumor primario. Finalmente, se observó que los pacientes con subtipo CBA tuvieron un peor pronóstico, encontrándose que de los 6 que fueron refractarios al tratamiento, el 50% (3/6) pertenecían al subtipo CBA, y el 66.6% de éstos (2/3) fueron los que tuvieron un peor desenlace clínico, reflejado en su defunción.

Los resultados obtenidos en este estudio sugieren el potencial de la determinación de los niveles de expresión de genes en CTCs de LDCBG, brindando una herramienta no invasiva para la subclasificación y el seguimiento a partir del diagnóstico y durante el tratamiento; así como a la determinación de factores pronósticos biológicos. Su uso como complemento a los estudios de inmunohistoquímica podría otorgar un panorama más amplio para el diagnóstico y seguimiento de los pacientes.

10. CONCLUSIONES

- Los niveles de expresión de los genes *CD10*, *BCL6* y *MUM1* permitieron subclasificar al 83.3% (25/30) de los pacientes analizados, encontrándose que esta técnica es de utilidad para la subclasificación de acuerdo con la célula de origen.
- Se encontró sobreexpresión de *BCL2*, *CD10*, *BCL6* y *MUM1* en CTCs de pacientes con LDCBG en distintos ciclos de quimioterapia, lo cual sugiere su uso potencial para el seguimiento a partir del diagnóstico y durante el tratamiento.
- Los pacientes subtipo CBA con sobreexpresión de *BCL2* tuvieron una peor respuesta post quimioterapia que aquellos con subtipo CG, concordando con lo que se reporta en estudios inmunohistoquímicos, demostrando que la detección en CTCs es una técnica sensible con valor pronóstico.
- Fue posible subclasificar mediante RT-qPCR al 8% (2/25) de los pacientes que no contaban con estudios inmunohistoquímicos, lo cual sugiere que la detección en CTCs tiene una mayor sensibilidad que las técnicas inmunohistoquímicas en tumor primario.
- La determinación de genes en CTCs ofrece una alternativa no invasiva para el fortalecimiento del diagnóstico del LDCBG, que puede complementar los estudios de inmunohistoquímica para ofrecer un panorama más amplio para el diagnóstico y pronóstico de esta neoplasia.

11. REFERENCIAS

- Abondanza, T.; Oliveira, C.; Barbosa, C.; Pereira, F.; Cunha, R.; Caires, A. *et al.* (2008). Bcl-2 expression and apoptosis induction in human HL60 leukaemic cells treated with a novel organotellurium (IV) compound RT-04. *Food and Chemical Toxicology*, 46 (7): 2540-5.
- Adamaki, M.; Lambrou, G.; Athanasiadou, A.; Tzanoudaki, M.; Vlahopoulos, S. & Moschovi, M. (2013). Implication of IRF4 aberrant gene expression in acute leukemias of childhood. *PLoS One*, 8 (8): e72326.
- Alizadeh, A.; Aranda, V.; Bardelli, A.; Blanpain, C.; Bock, C.; Borowki, C. *et al.* (2015). Toward understanding and exploiting tumor heterogeneity. *Nat Med*, 21 (8): 846-53.
- Alizadeh, A.; Eisen, M.; Davis, R.; Ma, C.; Lossos, I.; Rosenwald, A. *et al.* (2000). Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*, 403 (6769): 503-11.
- Ashworth, T. (1869). A Case of Cancer in Which Cells Similar to Those in the Tumours Were Seen in the Blood after Death. *Australian Med J*, 14; 146-7.
- Barrans, S.; Carter, I.; Owen, R.; Davies, F.; Patmore, R.; Haynes, A. *et al.* (2002). Germinal center phenotype and Bcl-2 expression combined with the International Prognostic Index improves patient risk stratification in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*, 99 (4): 1136-43.
- Baseggio, L.; Traverse-Glehen, A.; Berger, F.; Ffench, M.; Jallades, L.; Morel, D. *et al.* (2011). CD10 and ICOS expression by multiparametric flow cytometry in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Modern Pathology*, 24: 993-1003.
- Basqueira, A.; Márquez, M.; Vijnovich, A.; Picon, A. & Zerga, M. (2012). Linfoma difuso de células grandes B. *SAH*. Recuperado de http://www.sah.org.ar/docs/251-274.5B.SAH_GUIA2012_LinfomaCelulasGrandes_1.pdf
- Basso, K. & Dalla-Favera, R. (2012). Roles of BCL6 in normal and transformed germinal center B cells. *Immunol Rev*, 247: 172-83.
- Beltran, B.; Castillo, J.; Morales, D.; Hurtado de Mendoza, F.; Quinones, P.; Miranda, R. *et al.* (2011). EBV-positive diffuse large B-cell lymphoma of the elderly: A case series

from Peru. *Am J Hematol*, 86 (8): 663-7.

Berrios, R. (2007). *Frecuencia de enfermedades onco-hematológicas en el servicio de Hematología del Hospital General de México. Revisión de 6 años.* (Tesis de especialidad). Universidad Nacional Autónoma de México: México.

Cabel, L.; Proudhon, C.; Gortais, H.; Loirat, D.; Coussy, F.; Pierga, J. & Bidard, F. (2017). Circulating tumor cells: clinical validity and utility. *Int J Clin Oncol*, 22 (3): 421–30.

Camus, V., Jardin, F., & Tilly, H. (2017). The value of liquid biopsy in diagnosis and monitoring of diffuse large b-cell lymphoma: recent developments and future potential. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 17(6): 557-66.

Cano, A. (2019). *Biopsia líquida: Fundamento de la técnica y aplicación en tumores hematológicos* (Trabajo de fin de grado). Universidad Complutense, Madrid, España.

Cardenas, M.; Oswald, E.; Yu, W.; Xue, F.; MacKerell, A. & Melnick, A. (2016). The expanding role of the BCL6 oncoprotein as a cancer therapeutic target. *Clin Cancer Res*, 23 (4): 885-93.

Castellino, A.; Chiappella, A.; LaPlant, B.; Pederson, L.; Gaidamo, G.; Macon, W. *et al.* (2018). Lenalidomide plus R-CHOP21 in newly diagnosed diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL): long-term follow-up results from a combined analysis from two phase 2 trials. *Blood Cancer Journal*, 108 (8).

Cerón, R. (2019). *Detección de marcadores metastásicos en células tumorales circulantes y su correlación clínica en pacientes con linfoma difuso de células B grandes.* (Tesis de maestría). Universidad Nacional Autónoma de México, México.

Chomczynski, P. & Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 162 (1): 156-9.

Chorváth, B.; Seddlák, J.; Duraj, J.; Plesková, I.; Dubovský, P.; Augustinová, M. *et al.* (1990). Modulation of CALLA (CD10) antigen on cultured ALL (REH) cells: Effect of various modulators. *Neoplasma*, 37 (6): 609-18.

Coiffier, B. & Sarkozy, C. (2016). Diffuse large B-cell lymphoma: R-CHOP failure- what to do? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2 (1): 366-78.

Coiffier, B.; Lepage, E.; Briere, J.; Herbrecht, R.; Tilly, H.; Bouabdallah, R. *et al.* (2002). CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with

diffuse large B-cell lymphoma. *N Engl J Med*, 346 (4): 235-42.

Coutinho, R.; Clear, A.; Owen, A.; Wilson, A.; Matthews, J; Lee, A. *et al.* (2013). Poor concordance among nine immunohistochemistry classifiers of cell-of-origin for diffuse large B-cell lymphoma: Implications for therapeutic strategies. *Clin Cancer Res*, 19 (24): 6686-95.

Cresswell, P.; Springer, T.; Strominger, J.; Turner, M.; Grey, H. & Kubo, R. (1974). Immunological identity of the small subunit of HL-A antigens and beta2-microglobulin and its turnover on the cell membrane. *Proc Natl Acad Sci USA*; 71(5): 2123-7.

Davis, R.; Ngo, V.; Lenz, G.; Tolar, P.; Young, R.; Romesser, P. *et al.* (2010). Chronic Active B Cell Receptor Signaling in Diffuse Large B Cell Lymphoma. *Nature*, 463 (7277): 88-92.

Delbridge, A.; Grabow, S.; Strasser, A. & Vaux, D. (2016). Thirty years of BCL-2: translating cell death discoveries into novel cancer therapies. *Nat Rev Cancer*, 16 (2): 99-109.

Deschamps, L.; Handra-Luca, A.; O'Toole, D.; Sauvanet, A.; Ruzsniewski, P.; Belghiti, J. *et al.* (2006). CD10 expression in pancreatic endocrine tumors: Correlation with prognostic factors and survival. *Hum Pathol*; 37 (7): 802–8.

Diaz, L. A. & Bardelli, A. (2014). Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA. *J Clin. Oncol.* 32 (6), 579–586.

Duarte, M. (2014). Factores pronósticos en el linfoma B difuso de célula grande. *Acta Med Colomb*, 39 (2): 112-117.

Dunleavy, K. & Wilson, W. (2011). Differential Role of BCL2 in Molecular Subtypes of Diffuse Large B-cell Lymphoma. *Clin Cancer Res*, 17 (24): 7505-7.

Dunleavy, K.; Pittaluga, S.; Czuczman, M.; Dave, S.; Wright, G.; Grant, N. *et al.* (2009). Differential efficacy of bortezomib plus chemotherapy within molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*, 113 (24): 6069-76.

Eleta, M. (2008). PET en la evaluación de Linfomas: Fundamentos, fortalezas y debilidades. *Hematología*, 12 (2): 50-52.

Elghetany, M. (2002). Surface antigen changes during normal neutrophilic development: A critical review. *Blood Cells Molecules and Diseases*; 28 (2): 260-274.

Espinosa, E.; Ramón, L.; Izquierdo, L.; Ávila, O.; Hernández, C. & Espinosa, E. (2010). Rituximab: historia, farmacología y perspectivas. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 26 (1): 186-97.

Falini, B.; Fizzotti, M.; Pucciarini, A.; Bigerna, B.; Marafioti, T.; Gambacorta, M. *et al.* (2000). A monoclonal antibody (MUM1p) detects expression of the MUM1/IRF4 protein in a subset of germinal center B cells, plasma cells, and activated T cells. *Blood*. 95 (6): 2084–92.

Ferreira, M.; Ramani, V. & Jeffrey, S. (2016). Circulating tumor cell technologies. *Mol Oncol*, 10 (3): 374–94.

García, V.; González, M. & Bascones, A. (2006). Expresión de bcl-2, ki-67 y caspasa-3 en lesiones cancerosas de la mucosa oral. Resultados preliminares. *Av Odontoestomatol*, 22 (5): 263-9.

Girgis, M.; Farhan, S.; Janakiraman, N.; Peres, E. (2018). Outcome of Non-Germinal Center/Activated B-Cell Type Diffuse Large B-Cell Lymphoma Determined by IHC in a Single Institution Over 7 Years. *Biol Blood Marrow Transplant* 24: S263.

González, C. (2019). *Cuantificación de células tumorales circulantes y su asociación con resecabilidad en pacientes con adenocarcinoma ductal de páncreas*. (Tesis de especialidad). Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México.

Goy, A.; Ramchandren, R.; Ghosh, N.; Munoz, J.; Morgan, D.; Dang, H. *et al.* (2019). Ibrutinib plus lenalidomide and rituximab has promising activity in relapsed/refractory non-germinal center B-cell-like DLBCL. *Blood*, 134 (13): 1024-36.

Gualco, G.; Weiss, L. & Bacchi, C. (2010). MUM1/IRF4: A Review. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 18 (4): 301-10.

Hans, C.; Weisenburger, D.; Greiner, T.; Gascoyne, R.; Delabie, J.; Ott, G. *et al.* (2004). Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood*, 103 (1): 275-2.

He, X.; Chen, Z.; Fu, T.; Jin, X.; Yu, T.; Liang, Y. *et al.* (2014). Ki-67 is a valuable prognostic predictor of lymphoma but its utility varies in lymphoma subtypes: Evidence from a systematic meta-analysis. *BMC Cancer*, 14: 153.

Heintel, D.; Zojer, N.; Schreder, M.; Strasser-Weippl, K.; Kainz, B.; Vesely, M. *et al* (2008). Expression of MUM1/IRF4 mRNA as a prognostic marker in patients with multiple myeloma. *Leukemia*, 22 (2): 441-5.

Hong, J.; Yoon, H.; Ahn, H.; Sym, S.; Park, J.; Park, P. (2013). Prognostic Role of Serum Lactate Dehydrogenase Beyond Initial Diagnosis: A Retrospective Analysis of Patients with Diffuse Large B Cell Lymphoma. *Acta Haematol*; 130: 305-11.

Hunt, K. & Reichard, K. (2008). Diffuse large B-cell lymphoma. *Arch Pathol Lab Med*; 132 (1): 118-24.

Hwang, H.; Park, C.; Suh, C. & Huh, J. (2014). High concordance of gene expression profiling-correlated immunohistochemistry algorithms in diffuse large B-cell lymphoma, not otherwise specified. *Am J Surg Pathol*, 38 (8): 1046-57.

Hwang, H.; Yoon, D.; Suh, C.; Park, C. & Huh, J. (2013). Prognostic value of immunohistochemical algorithms in gastrointestinal diffuse large B-cell lymphoma. *Blood Res*, 48 (4): 266-73.

Iglesias, C. (2017). *El papel del oncogén BCL6 en linfomas B.* (Tesis de grado). Universidad de Cantabria: España.

Ignatiadis, M.; Lee, M. & Jeffrey, S. (2015). Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA: Challenges and Opportunities on the Path to Clinical Utility. *Clin Cancer Res*, 21(21): 4786–800.

Ilie, M.; Hofman, V.; Long, E.; Bordone, O.; Selva, E.; Washetine, K. *et al.* (2014). Current challenges for detection of circulating tumor cells and cell-free circulating nucleic acids, and their characterization in non-small cell lung carcinoma patients. What is the best blood substrate for personalized medicine? *Ann Transl Med*, 2 (11): 107.

Iqbal, J.; Nappalli, V.; Wright, G.; Dave, B.; Horsman, D.; Rosenwald, A. *et al.* (2006). BCL2 expression is a prognostic marker for the activated B-cell-like type of diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol*, 24 (6): 961-8.

Jaffe, E.; Arber, D.; Campo, E.; Lee, N. & Quintanilla, L. (2017). *Hematopathology*. Philadelphia, USA: Elsevier.

Jaime, J. & Gómez, D. (2015). *Hematología. La sangre y sus enfermedades.* (4ta ed.) México: McGraw-Hill Interamericana Editores, S.A. de C.V.

Jeffrey, W.; Matera, J.; Craig, M.; Repollet, M.; Connelly, M.; Rao, C. *et al.* (2004). Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases. *Clin Cancer Res*, 10 (20): 6897-904.

Jia, S.; Zhang, R.; Li, Z. & Li, J. (2017). Clinical and biological significance of circulating tumor cells, circulating tumor DNA, and exosomes as biomarkers in colorectal cancer. *Oncotarget*, 18 (8): 55632-45.

Jo, J.; Lee, H.; Suh, C.; Kang, H.; Kim, W.; Eom, H. *et al.* (2019) Open-Labeled, Multicenter Phase II Study of Bortezomib for Maintenance Therapy in Patients with High Risk Diffuse Large B Cell Lymphoma (DLBCL): Borna Trial from Consortium for Improving Survival of Lymphoma (CISL). *Blood*, 134 (1): 2884

Jo, J.; Yoo, C.; Ahn, Y.; Park, S.; Kim, S.; Lee, D. *et al.* (2010). Comparison Between CD20-Negative and CD20-Positive Diffuse Large B Cell Lymphoma; Characteristics and Clinical Outcome. *Blood*, 116 (21): 4891.

Kagan, M.; Howard, D; Bendele, T.; Rao, C. & Terstappen, L. (2002). A sample preparation and analysis system for identification of circulating tumor cells. *J Clin Ligand Assay*, 25: 104-10.

Kang, Y.; Kim, Y.; Lee, T.; Cho, Y.; Chang, H. & Lee, H. (2018). Cytopathological Study of the Circulating Tumor Cells filtered from the Cancer Patients' Blood using Hydrogel-based Cell Block Formation. *Scientific Reports*, 8 (1): 1-12.

Labardini, J.; Cervera, E.; Corrales, C.; Balbuena, M.; Barbosa, A.Espinoza, J. *et al.* (2011). Oncoguía: Linfoma no Hodgkin. *Cancerología*. 6: 139-152.

Lenz, G. & Staudt, L. (2010). Aggressive Lymphomas. *N Engl J Med*, 362 (15): 1417-29.

Lenz, G.; Wright, G.; Dave, S.; Xiao, W.; Powell, J.; Zhao, H. *et al.* (2008). Stromal Gene Signatures in Large B-Cell Lymphomas. *N Engl J Med*, 359 (22): 2313-23.

Li, Z.; Huang, J.; Xia, Y.; Zhu, Y.; Zhao, W.; Wei, W. *et al.* (2012). High Ki-67 expression in diffuse large B-cell lymphoma patients with non-germinal center subtype indicates limited survival benefit from R-CHOP therapy. *Eur J Haematol*, 88: 510-7.

- Lohr, J.; Kim, S.; Gould, J.; Knoechel, B.; Drier, Y.; Cotton, M. *et al.* (2016). Genetic interrogation of circulating multiple myeloma cells at single-cell resolution. *Sci Transl Med*, 8 (363): 363ra147.
- Long, E.; Ilie, M.; Bence, C.; Butori, C.; Selva, E.; Lalvée, S. *et al.* (2016). High expression of TRF2, SOX10, and CD10 in circulating tumor microemboli detected in metastatic melanoma patients. A potential impact for the assessment of disease aggressiveness. *Cancer Medicine*, 5(6): 1022–1030.
- Lossos, I.; Czerwinski, D.; Alizadeh, A.; Wechser, M.; Tibshirani, R.; Botstein, D. *et al.* (2004). Prediction of survival in diffuse large-B-cell lymphoma based on the expression of six genes. *N Engl J Med*, 350 (18): 1828-37.
- Lowes, L.; Bratman, S.; Dittamore, R.; Done, S.; Kelley, S.; Mai, S. *et al.* (2016). Circulating tumor cells (CTC) and cell-free DNA (cfDNA) workshop 2016: scientific opportunities and logistics for cancer clinical trial incorporation. *Int J Mol Sci*, 17 (9):1505.
- Lu, T.; Miao, Y.; Wu, J.; Gong, Q.; Liang, J.; Wang, Z. *et al.* (2016). The distinct clinical features and prognosis of the CD10+ MUM1+ and dCD10-Bcl6-MUM1- diffuse large B-cell lymphoma. *Sci Rep*; 6: 20465.
- Ma, L. & Su, L. (2018). Application of Lenalidomide on Diffuse Large B-cell Lymphoma: Salvage, Maintenance, and Induction Treatment. *Chin Med J*, 131 (20): 2510-3.
- Maguer-Satta, V.; Besançon, R. & Bachelard, E. (2011). Concise review: Neutral Endopeptidase (CD10): A multifaceted environment actor in stem cells, physiological mechanisms and cancer. *Stem Cells*, 29 (3): 389-96.
- Marini, O.; Costa, S.; Bevilacqua, D.; Calzetti, F.; Tamassia, N.; Spina, C. *et al.* (2017). Mature CD10+ and immature CD10- neutrophils present in G-CSF-treated donors display opposite effects on T-cells. *Blood*, 129(10), 1343–56.
- Masuda, T.; Hayashi, N.; Iguchi, T.; Ito, S.; Eguchi, H. & Mimori, K. (2016). Clinical and biological significance of circulating tumor cells in cancer. *Mol Onc*; 10 (3): 408-17.
- Mejía, S.; Molina, A.; Duque, G.; Arias, F. (2015). Estudio descriptivo: Características clínicas, demográficas e histopatológicas de pacientes con diagnóstico de Linfoma no Hodgkin. *Rev Med HJCA*, 7 (3): 230-5.

Messaritakis, I.; Nikolaou, M.; Politaki, E.; Koinis, F.; Lagoudaki, E.; Koutsopoulos, A. (2018). Bcl-2 expression in circulating tumor cells (CTCs) of patients with small cell lung cancer (SCLC) receiving front-line treatment. *Lung Cancer*, 124: 270-8.

Mezhoud, F. (2018). *Lymphomes*. Recuperado de <http://univ.ency-education.com/uploads/1/3/1/0/13102001/hemato4an-lymphomes2019mezhoud.pdf>

Miralles, P.; Navarro, J., Berenguer, J.; Gómez, J.; Kwon, M.; Serrano, D. *et al.* (2017). *Recomendaciones de GeSIDA/PETHEMA sobre el diagnóstico y tratamiento de los linfomas de pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana. Guía de Práctica Clínica de GeSIDA*. España: GeSIDA.

Mishra, D.; Singh, S. & Narayan, G. (2016). Role of B Cell Development Marker CD10 in Cancer Progression and Prognosis. *Mol Biol International*, 2016: 1-9.

Morschhauser, F.; Feugier, P.; Flinn, I.; Gasirowski, R.; Greil, R. Illés, A. *et al.* (2018). Venetoclax plus rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine and prednisolone (R-CHOP) improves outcomes in bcl2-positive first-line diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL): first safety, efficacy and biomarker analyses from the phase II CAVALLI Study. *Blood*, 132 (1): 782.

Müller, A.; Torres, M.; Soyano, A. & Soyano, A. (2017). Tratamiento del linfoma difuso de células B grandes (LDCBG) en estadios avanzados. *Gac Méd Caracas*, 125 (4): 276-98.

Muramatsu, M.; Kinoshita, K, Fagarasan, S.; Yamada, S.; Shinkai, Y. & Honjo, T. (2000). Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell*, 102 (5): 553-63.

Na, H.; Choe, J.; Shin, S.; Kim, H.; Han, J.; Kim, H. *et al.* (2019). Characteristics of CD5-positive diffuse large B-cell lymphoma among Koreans: High incidence of BCL2 and MYC double-expressors. *PLoS One*, 14 (10): e0224247.

Noboa, A.; Colmener, L.; Sánchez, E.; Lupera, H. & Terán, J. (2018). Importancia de los criterios (o escala) de Deauville en la valoración de respuesta temprana al tratamiento en linfomas con 18F-FDG PET/CT. *Federación Ecuatoriana de Radiología e Imagen*, 11 (1): 27-34.

Nowarowski, G.; LaPlant, B.; Macon, W.; Reeder, C.; Foran, J.; Nelson, G. *et al.* (2015). Lenalidomide combined with R-CHOP overcomes negative prognosis impact of non-

germinal center B-cell phenotype in newly diagnosed diffuse large B-cell lymphoma: A phase II study. *J Clin Oncol*, 33 (3): 251-7.

Ohshima, K.; Kawasaki, C.; Muta, H.; Muta, K.; Deyev, V.; Haraoka, S. *et al.* (2001). CD10 and Bcl10 expression in diffuse large B-cell lymphoma: CD10 is a marker of improved prognosis. *Histopathology*, 39(2): 156–62.

Olivier, C. & Carballido, J. (2010). Células tumorales circulantes: aislamiento, cuantificación y relevancia de su traslación a la práctica asistencial. *Actas Urol Esp*, 34 (1): 3-5.

Organización Mundial de la Salud. (2018). *Cáncer*. Recuperado de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>

Orlowski, R. & Kuhn, D. (2008). Proteasome Inhibitors in Cancer Therapy: Lessons From the First Decade. *Clin Cancer Res*, 14 (6): 1649-57.

Pérez-Cruz, P. & Acevedo, F. (2014). Escalas de estado funcional (o performance status) en cáncer. *Gastroenterol latinoam*, 25 (3): 219-226.

Pérez-Zúñiga, J.; Aguilar-Andrade, C.; Álvarez-Vera, J.; Augusto-Pacheco, M.; Báez-Islas, P. *et al.* (2018). Generalidades sobre linfomas. *Rev Hematol Mex*; 19 (4): 174-88.

Potdar, P. & Lotey, N. (2015). Role of circulating tumor cells in future diagnosis and therapy of cancer. *J Cancer Metastasis Treat*, 1: 44.

Ramírez, M.; Márquez, H.; Barranco. & G. López, J. (2014). Bcl2: su papel en el ciclo celular, apoptosis y cáncer. *El residente*, 9 (3): 84-94.

Reed, J. (1997). Bcl-2 family proteins: Regulators of apoptosis and chemoresistance in hematologic malignancies. *Semin Hematol*, 34: 9-19.

Rimsza, L.; Wright, G.; Schwartz, M.; Chan, W.; Jaffe, E.; Gascoyne, R. *et al.* (2011). Accurate classification of diffuse large B-cell lymphoma into germinal center and activated B-cell subtypes using a nuclease protection assay on formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Clin Cancer Res*; 17 (11): 3727-32.

Rojas, E.; Knott, M.; Bal de Kier, E.; Zerga, M.; Nuñez, M.; Puricelli, L. *et al.* (2016). Oct2, BCL6, IRF8, OCAB and PU.1 in the Assessment of Prognosis in Diffuse Large B Cell Lymphoma Patients. *J Mol Biomarkers Diagn*, 7(2): 276.

Romero, M.; Hernández, M.; Durán, M.; Mandujano, G. & Alcántara, A. (2006) Linfoma B difuso de células grandes. Características patológicas y de inmunofenotipo en 148 pacientes estudiados en el Hospital General de México. *Rev Med Hosp Gen Mex*; 69 (4): 192-8.

Sans-Sabrafen, J.; Besses, R. & Vives, J. (2006). *Hematología clínica*. (5ta ed.) Madrid, España: Elsevier.

Satou, A.; Asano, N.; Kato, S.; Elsayed, A.; Nakamura, N.; Miyoshi, H. *et al.* (2017). Prognostic Impact of MUM1/IRF4 Expression in Burkitt Lymphoma (BL): A Reappraisal of 88 BL Patients in Japan. *Am J Surg Pathol*, 41 (3): 389-95.

Scherer, F.; Kurtz, D.; Newman, A.; Stehr, H.; Craig, A.; Esfahani, M. *et al.* (2016). Distinct biological subtypes and patterns of genome evolution in lymphoma revealed by circulating tumor DNA. *Sci Transl Med*, 8 (364): 364ra155.

Schuetz, J.; Johnson, N.; Morin, R.; Scott, D.; Tan, K.; Ben-Nierah, S. *et al.* (2012). BCL2 mutations in diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia*; 26: 1383-90.

Sehn, L.; Berry, B.; Chhanabhai, M.; Fitzgerald, C.; Gill, K.; *et al.* (2007). The revised International Prognostic Index (R-IPI) is a better predictor outcome than the standard IPI for patients with diffuse large B cell-lymphoma treated with R-CHOP. *Blood*; 109 (5):1857- 61.

Shaffer, A.; Emre, N.; Romesser, P. & Staudt, L. (2009). IRF4: Immunity. Malignancy! Therapy? *Clin Can Res*, 15 (9): 2954-61.

Shipp, M. & Look, T. (1993). Hematopoietic Differentiation Antigens That Are Membrane-Associated Enzymes: Cutting Is the Key! *Blood*; 82 (4): 1052-70.

Slone, W.; Moses, B.; Hare, I.; Evans, R.; Piktel, D. & Gibson, L. (2016). BCL6 modulation of acute lymphoblastic leukemia response to chemotherapy. *Oncotarget*, 7 (17): 23439-53.

Smerage, J.; Budd, G.; Doyle, G.; Brown, M.; Paoletti, C.; Muniz, M. *et al.* (2013). Monitoring apoptosis and Bcl.2 on circulating tumor cells in patients with metastatic breast cancer. *Mol Oncol*, 7(3): 680-92.

Smerage, J.; Doyle, G.; Budd, G.; Repollet, M.; Miller, C., Terstappen, L. *et al.* (2008). Detection of Bcl-2 and apoptosis in circulating tumor cells during treatment of metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*; 26 (15): 11016.

Sociedad Española de Geriátría y Gerontología. (2006). *Tratado de Geriátría para residentes: Hematología*. España: International Marketing & Communication S.A.

Sofo, A.; Chikha, A.; Gojak, R. & Suljovic, E. (2016). Expression IRF/MUM1>25% Predictor to Three-year Survival of Diffuse Large B Cell Lymphoma in the Immunochemotherapy Era. *Med Arch*, 70 (5): 342-7.

Song, M.; Chung, J.; Shin, D.; Seol, Y.; Shin, H.; Choi, Y. & Cho, G. (2009). Prognostic significance of the Bcl-2 negative germinal centre in patients with diffuse large B cell lymphoma treated with R-CHOP. *Leukemia & Lymphoma*, 50(1), 54–61.

Swerdlow, S.; Campo, E.; Harris, N.; Jaffe, E. *et al.* (2017). *World Health Organization Classification of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. Francia: International Agency for Research on Cancer: 291-7.

Tanaka, N., & Taniguchi, T. (2000). The interferon regulatory factors and oncogenesis. *Seminars in Cancer Biology*, 10(2), 73–81.

Terauchi, M.; Kajiyama, H.; Shibata, K.; Ino, K.; Mizutani, S. & Kikkawa, F. (2005). Anti-progressive effect of neutral endopeptidase 24.11 (NEP/CD10) on cervical carcinoma in vitro and in vivo. *Oncology*, 69 (1): 52–62.

The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project. (1993). A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med*; 329(14): 987-94.

Tibiletti, M.; Martin, V.; Bernasconi, B.; Del Curto, B.; Pecciarini, L.; Uccella, S. *et al.* (2009). BCL2, BCL6, MYC, MALT 1, and BCL10 rearrangements in nodal diffuse large B-cell lymphomas: a multicenter evaluation of a new set of fluorescent in situ hybridization probes and correlation with clinical outcome. *Hum Pathol*, 40 (5): 645-52.

Tirado, L. & Mohar, A. (2007). Epidemiología de las neoplasias hemato-oncológicas. *Cancerología*, 2 (1): 109-20.

Tokuhara, T.; Adachi, M.; Hashida, H.; Ishida, H.; Taki, T.; Higashiyama, M. *et al.* (2001). Neutral endopeptidase/CD10 and aminopeptidase N/CD13 gene expression as a

prognostic factor in non-small cell lung cancer. *Jpn J Thorac Cardiovasc Surg*; 49 (8): 489–96.

Tsuyama, N.; Sakata, S.; Baba, S.; Mishima, Y.; Nishimura, N. Ueda, K. *et al.* (2017). BCL2 expression in DLBCL: reappraisal of immunohistochemistry with new criteria for therapeutic biomarker evaluation. *Blood*, 130 (4): 489-500.

Uherova, P.; Ross, C.; Schnitzer, B.; Singleton, T. & Finn, W. (2001). The clinical significance of CD10 antigen expression in diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Clin Pathol*; 115 (4): 582-8.

Vargas, J. & Hurtado, R. (2011). Adenomegalia. *Rev Fac Med*, 54 (4): 10-23.

Wagner, S.; Ahearne, M. & Ko-Ferrigno, P. (2011). The role of BCL6 in lymphomas and routes to therapy. *Br J Haematol*, 152 (1): 3-12.

Wang, C.; Hu, J.; Lu, M.; Gu, H.; Zhou, X.; Chen, X. *et al.* (2015). A panel of five serum miRNAs as a potential diagnostic tool for early-stage renal cell carcinoma. *Sci Rep*, 5: 7610.

Weissleder, R. & Pittet, M. (2008). Imaging in the era of molecular oncology. *Nature*, 452 (7187): 580-9.

Wilson, W.; Young, R.; Schmitz, R.; Yang, Y.; Pittaluga, S.; Wright, G. *et al.* (2015). Targeting B cell receptor signaling with ibrutinib in diffuse large B-cell lymphoma. *Nat Med*, 21 (8):922-6.

Xerri, L.; Bachy, E.; Canioni, D.; Chassagne-Clément, C.; Dartigues-Cuillères, P. *et al.* (2014). Identification of MUM1 as a prognostic immunohistochemical marker in follicular lymphoma using computerized image analysis. *Hum Pathol*, 45 (10): 2085-93.

Yadav, C.; Ahmad, A.; D´Souza, B.; Agarwal, A.; Nandini, M.; Prabhu, K.; *et al.* (2016). Serum Lactate Dehydrogenase in Non-Hodgkin’s Lymphoma: A Prognostic Indicator. *Indian J Clin Biochem*; 31(2): 240-2.

Younes, A. Sehn, L.; Johnson, P.; Zinzani, P.; Hong, X.; Zhu, J. *et al.* (2019). Randomized Phase III Trial of Ibrutinib and Rituximab Plus Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine, and Prednisone in Non-Germinal Center B-Cell Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *J Clin Oncol*, 37 (15): 1285-1295.

Young, R.; Shaffer, A.; Phelan, J. & Staudt, L. (2015). B-cell receptor signaling in diffuse

large B-cell lymphoma. *Semin Hematol*, 52 (2): 77-85.

Zhong, W.; Xu, X, Zhu, Z.; Du, Q.; Du, H.; Yang, L. *et al.* (2017). Increased expression of IRF8 in tumor cells inhibits the generation of Th17 cells and predicts unfavorable survival of diffuse large B cell lymphoma patients. *Oncotarget*, 8: 49757-72.

12. ANEXOS



AMIINSHAE

V CONGRESO AMIINSHAE

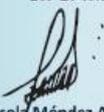
La Asociación Mexicana de Investigadores de los
Institutos Nacionales de Salud y Hospitales de Alta Especialidad
otorga la presente CONSTANCIA a:

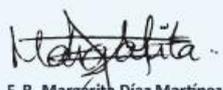
León-Lara MA, Cerón-Maldonado R, Álvarez-Suárez JA, Ramos-Peñañiel CO,
García-Laguna AI, De la Cruz-Rosas A, Mendoza-Salas I, Mendoza-García ER,
Palmeros-Morgado G, Collazo-Jaloma J, Martínez-Tovar A, Olarte-Carrillo I

Por su participación con el trabajo

Sobreexpresión de BCL2 en Células Tumorales Circulantes derivadas de Linfoma Difuso de Células B Grandes

En la exposición de carteles, realizada los días 10 y 11 de diciembre de 2019
en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán


Dra. Marisela Méndez Armenta
Presidencia Colegiada AMIINSHAE


Q. F. B. Margarita Díaz Martínez
Presidenta del Colegio INCMNSZ

Compartiendo principios en camino a la investigación interdisciplinaria

La Agrupación Mexicana para el Estudio de la Hematología A.C. otorga la presente

CONSTANCIA

A:

Miriam Aremi León Lara, Adolfo Martínez Tovar, Rafael Cerón Maldonado, Christian Omar Ramos Peñafiel, Iveth Mendoza Salas, Anel Irais García Laguna, Adrián De la Cruz Rosas, Jorge Armando Álvarez Suárez, Juan Collazo Jaloma, Juan Julio Kassack Ipiña e Irma Olarte Carrillo

Por su participación con el trabajo en cartel:

“DETECCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE BCL2 Y BCL6 COMO GENES IMPLICADOS EN LA RESISTENCIA A LA APOPTOSIS EN CÉLULAS TUMORALES CIRCULANTES DERIVADAS DE LINFOMA DIFUSO DE CÉLULAS B GRANDES” en el

LXI Congreso Nacional de Hematología de la AMEH

17 de octubre, 2020



Dr. Oscar Hernández Zamudio
PRESIDENTE AMEH A.C.



Dr. Carlos Martínez Murillo
VOCAL DE ACTIVIDADES ACADÉMICAS
AMEH A.C.