

## TESIS DOCTORAL

**IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES DE UTILIDAD DIAGNÓSTICA Y PRONÓSTICA EN LINFOMA B DE CÉLULA GRANDE AGRESIVO.**

***IDENTIFICATION OF DIAGNOSTIC AND PROGNOSTIC MARKERS IN AGGRESSIVE LARGE B CELL LYMPHOMA.***

Tesis presentada por **Santiago Montes Moreno**.

Director de tesis: Dr. Miguel Angel Piris Pinilla. Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander.

Tutor de tesis: Dr. Fidel Fernandez . Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander.

Facultad de Medicina

Universidad de Cantabria

Cantabria 2014

## RESUMEN DE LA TESIS DOCTORAL.

El linfoma es una neoplasia de las células linfoides que representa aproximadamente el 4% de los nuevos casos de cáncer al año, con una incidencia en tendencia ascendente que supone cerca de 93 000 nuevos casos al año en Europa. (GLOBOCAN 2008 (IARC) [Section of Cancer Information](#) (23/8/2010)). A pesar de los avances en la quimioterapia de combinación con antraciclinas e incluyendo inmunoterapia con anticuerpos monoclonales (i.e antiCD20), existe aún un grupo significativo de pacientes (30-40%), que permanece refractario a la terapia o falla precozmente a la misma. En este grupo de linfomas agresivos se incluye el Linfoma B Difuso de Célula Grande (LBDCG), que constituye el tipo más frecuente de Linfoma no Hodgkin (LNH) en adultos. La estimación del pronóstico de los pacientes con LBDCG tratados con quimioinmunoterapia se basa fundamentalmente en criterios clínicos. Sin embargo hay evidencia suficiente de que los rasgos biológicos de la neoplasia condicionan su conducta y pueden ser utilizados también para predecir el curso clínico post-tratamiento.

El **objetivo** fundamental de la presente tesis doctoral es doble. Por un lado se pretende la identificación de marcadores biológicos de utilidad diagnóstica y pronóstica en Linfoma B Difuso de Célula Grande. Por otro lado se trabaja en la descripción de entidades clinicopatológicas concretas (i.e Linfoma

Plasmablastico y Linfoma B Difuso de Célula Grande asociado a EBV y edad avanzada).

Para el primer fin se utilizan diversos métodos moleculares para la identificación inicial de estos marcadores (expresión de genes, expresión de microARNs), se generan herramientas para su detección en muestras biológicas diagnósticas (anticuerpos monoclonales contra dianas específicas, PCR cuantitativa para la medida de la expresión de microARNs) y se correlacionan los datos de expresión con variables clínicas (categoría diagnóstica y curso clínico) para determinar su aplicabilidad como marcadores diagnósticos y/o pronósticos.

Se identifican 2 proteínas de interés diagnóstico y pronóstico en este tipo de linfomas, GCET1 y PRDM1/Blimp1. La expresión inmunohistoquímica de GCET1 se restringe a neoplasias linfoides de línea B que muestran un estadio de diferenciación centrogerminal, incluyéndose aquí: Linfoma B folicular, Linfoma de Hodgkin de tipo predominio Linfocítico Nodular, Linfoma B rico en células T e histiocitos, Linfoma de Burkitt y un subgrupo de Linfomas B de célula grande. Posteriormente se ha observado que la expresión de GCET1 puede utilizarse en paneles diagnósticos para diferenciar las formas tipo GCB y tipo ABC de LBDCG. La expresión de PRDM1/Blimp1 se encuentra en neoplasias que muestran diferenciación terminal, entre ellas el linfoma plasmablastico y un subgrupo de pacientes con LBDCG que, tras ser tratados con R-CHOP, muestran un curso clínico particularmente agresivo.

Adicionalmente, se describe la identificación de un perfil de microARNs con valor pronóstico generado en una serie retrospectiva de 259 pacientes con

Linfoma B Difuso de Células Grandes tratados de forma uniforme con la terapia estándar (R-CHOP). Para esto se ha cuantificado la expresión de un grupo seleccionado de estos microARNs mediante PCR cuantitativa a tiempo real a partir de ARN extraído de tejido fijado en formol e incluido en parafina (FFIP), como el que se maneja en la rutina diagnóstica habitual en los laboratorios de anatomía patológica.

Para el segundo fin se aplican los marcadores previamente identificados a series de muestras de pacientes que presentan dos tipos de linfoma, el linfoma plasmablastico y el linfoma B difuso de célula grande asociado a EBV y edad avanzada. En estas series se realiza una caracterización fenotípica amplia de las muestras tumorales y una recogida selectiva de datos clínicos al diagnóstico y durante el seguimiento. Finalmente se realiza una correlación de los datos moleculares y biológicos con las características clínicas, con la idea de estratificar pacientes con diferente pronóstico y respuesta a la terapia que puedan recibir terapias alternativas a la estándar.

## ÍNDICE

I	INTRODUCCIÓN	
1.	Linfoma B difuso de célula grande. Definición.	8
2.	Heterogeneidad clínica del LBDCG.	9
	2a. Modelos clínicos pronósticos.	10
	2b. Opciones terapéuticas.	11
3.	Caracterización clinicopatológica del LBDCG.	13
	3a. Clasificación del LBDCG según la OMS.	13
	3b. Clasificación basada en perfiles de expresión (ARNm).	16
	3c. Modelos de expresión inmunohistoquímica. Correlación imperfecta con los perfiles de expresión.	19
	3d. Otros marcadores de expresión inmunohistoquímica y su utilidad en la clasificación diagnóstica del LBDCG.	20
4.	Identificación de nuevos marcadores moleculares a partir de estudios de expresión. Perfiles de expresión de microARNs.	21
	4a. microARNs. Definición, estructura y función.	22
	4b. microARNs en neoplasias linfoides.	22
II	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	23
III	RESULTADOS	24

PRIMER TRABAJO: GCET-1 es un marcador restringido a un subgrupo de linfomas B derivados del centro germinal. (de “Gcet1 (centerin), a highly restricted marker for a subset of germinal center-derived lymphomas”)(1)

24

SEGUNDO TRABAJO: Expresión de microARNs en linfoma B difuso de célula grande tratado con quimioinmunoterapia. (de“ miRNA expression in diffuse large B-cell lymphoma treated with chemoimmunotherapy”)(2)

33

TERCER TRABAJO: Linfomas B agresivos con diferenciación plasmocelular: caracterización inmunohistoquímica del linfoma plasmablástico y el linfoma B difuso de célula grande con un fenotipo plasmablástico parcial. (de “Aggressive large B-cell lymphoma with plasma cell differentiation: immunohistochemical characterization of plasmablastic lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma with partial plasmablastic phenotype”)(3)).

45

CUARTO TRABAJO: El linfoma B difuso de célula grande EBV positivo asociado a la edad avanzada es una neoplasia agresiva de fenotipo post-centrogerminal caracterizada por una activación intensa de NF-kB (de “EBV-positive diffuse large B-cell lymphoma of the elderly is an aggressive post-germinal center B-cell neoplasm characterized by prominent nuclear factor-kB activation”)(4)).

55

IV DISCUSION

70

V CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

87

VI PACIENTES, MATERIALES Y MÉTODOS.

90

VII BIBLIOGRAFÍA.	92
ANEXO. PUBLICACIONES ORIGINALES	102
Material suplementario de publicaciones en formato digital en CD.	

## **1. Linfoma B Difuso de células Grandes. Definición.**

El Linfoma B Difuso de Célula Grande (LBDCG) es la forma más frecuente de linfoma no Hodgkin (LNH) en adultos y da cuenta de cerca del 80% de los linfomas agresivos en este grupo de edad (5). Según la más reciente clasificación de la OMS, se define como una neoplasia linfoide de células B grandes (i.e el núcleo de una única célula neoplásica es al menos dos veces el de un linfocito normal o mayor que el núcleo de un macrófago) que infiltran de forma difusa el tejido (6). Este tipo de linfoma puede ocurrir en localizaciones ganglionares o extraganglionares. Existe una marcada heterogeneidad clínica y biológica en este grupo de neoplasias linfoides, de modo que se distinguen hasta 12 entidades clínico-patológicas para este subgrupo de LNH.

La mayoría, sin embargo, no tienen características clínicas o patológicas específicas de modo que se recogen en la categoría de LBDCG B, NOS (de *No Other Specified*)(7). Las entidades clínico-patológicas se distinguen entre sí por la combinación particular de características clínicas, patológicas y biológicas-moleculares. Algunas de estas entidades son relativamente infrecuentes (por ejemplo el linfoma B de células grandes ALK positivo, con menos de cien casos descritos en la literatura(8-14)) y afectan a un número limitado de pacientes. No obstante, se insiste en su identificación precisa para tratar de encontrar aproximaciones terapéuticas basadas en las alteraciones moleculares específicas de estas neoplasias (7). Así, el avance en la subclasificación molecular del LBDCG permitirá, en un futuro reciente, un abordaje terapéutico personalizado para casos con diferentes alteraciones genéticas, de modo que



es esperable una incorporación gradual de esta subclasificación molecular del LBDCG al proceso diagnóstico clínico.

## **2. Heterogeneidad clínica del LBDCG.**

En general, el LBDCG es una enfermedad agresiva pero potencialmente curable con quimioterapia de combinación. El porcentaje medio de pacientes que alcanzan Remisión completa (RC) tras el tratamiento de primera línea estándar que combina antraciclinas (régimen tipo CHOP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisona) con anti CD20 (Rituximab) es cercano al 75-80% y se observan supervivencias libres de progresión (PFS) próximas al 60%, con pequeñas variaciones según las series(15-19).

Sin embargo, esta neoplasia muestra una conducta clínica heterogénea con gran variabilidad en la respuesta a las terapias convencionales, asociada a factores de riesgo clínico. Se reconocen como factores de riesgo clínico independientes: el estadio Ann Arbor (I a IV, de riesgo si es superior a II), la presencia de enfermedad voluminosa (bulky, >10 cm), la elevación de lactato deshidrogenasa (LDH) en suero, edad mayor de 60 años y situación funcional o *Performance Status*/ECOG  $\geq 2$ . De éstos, es crítico en la decisión terapéutica el estadiaje, que identifica si se trata de enfermedad localizada o diseminada y si hay presencia de masa voluminosa. Las herramientas utilizadas en el estadiaje de los pacientes incluyen la realización de TAC toracoabdominal, biopsia de médula ósea y tomografía por emisión de positrones combinada con tomografía axial computerizada (TEP-TAC) evaluado según los criterios de respuesta estandarizados por el International Working Group (IWG) (20).

En función de estos factores de riesgo clínico, se diseña la conducta terapéutica óptima (21) y se pueden calcular índices pronósticos con las terapias estándar como el índice Pronóstico Internacional (IPI)(16, 22).

## **2a. Modelos clínicos pronósticos.**

El Índice Pronóstico Internacional ha sido la herramienta clínica fundamental en las últimas décadas en la predicción del riesgo clínico en pacientes con LBDCG (22). Basado en cinco características clínicas (edad, estadio tumoral, concentración de lactato deshidrogenasa en suero (LDH), situación funcional (ECOG (*Eastern Cooperative Group*) o *PS (Performance Status)*) y número de localizaciones extraganglionares afectas) el IPI ha sido capaz de discriminar cuatro grupos clínicos discretos con diferente supervivencia global a los 5 años en pacientes tratados con quimioterapia basada en antraciclinas, sin inmunoterapia. Tras la introducción de inmunoterapia de combinación con Rituximab, la respuesta global de los pacientes con LBDCG a la terapia con Rituximab ha mejorado notablemente, encontrándose que bajo este esquema terapéutico, las tasas de supervivencia global oscilan entre el 94 % para los pacientes de bajo riesgo hasta el 55% para los pacientes de riesgo elevado(16). Esta subclasificación (IPI-revisado), basada exclusivamente en parámetros de ámbito clínico, sin embargo, no permite identificar pacientes con menos de un 50% de probabilidades de supervivencia, por lo que se restringe su valor en la identificación de candidatos a terapias alternativas a las convencionales. Recientemente, con la intención de mejorar este aspecto negativo se ha desarrollado un nuevo índice pronóstico (NCCN-IPI) que, teniendo en cuenta 5 parámetros clínicos (edad, LDH, sitios afectos, estadio

Ann Arbor y ECOG) discrimina con mayor precisión entre los grupos de bajo y alto riesgo (supervivencias globales a los 5 años de 96% frente a 33%, respectivamente). Este índice compara favorablemente con el IPI en la única serie analizada (supervivencias globales a los 5 años de 90% frente a 54%, para los grupos de bajo y alto riesgo)(23).

Adicionalmente, a pesar de la mejora de la supervivencia obtenida con los protocolos terapéuticos más actuales incluyendo inmunoterapia con Rituximab, un 30-40% de pacientes tratados con las terapias de primera línea con combinación R-CHOP o equivalentes presentarán recaída o progresión de la enfermedad. (15, 16, 24-27).

Este hecho, (i.e. la insuficiencia de los modelos basados en parámetros clínicos para la identificación precoz de pacientes refractarios o con mal pronóstico) estimula la búsqueda de otros marcadores, donde se incluyen los biológicos de la propia neoplasia, que permitan captar la naturaleza agresiva de estas neoplasias. Idealmente estos marcadores deberían ser capaces de predecir la respuesta a la terapia, más allá de tener un valor meramente pronóstico de supervivencia global o libre de progresión.

## **2b. Opciones terapéuticas.**

La quimioterapia de combinación basada en antraciclinas con CHOP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisona) ha transformado el LBDCG de una neoplasia fatal en una enfermedad potencialmente curable y ha sido la terapia de elección durante las últimas décadas (16). Recientemente, la introducción de inmunoterapia de combinación con el anticuerpo monoclonal

antiCD20, Rituximab ha conducido a una marcada mejoría de la supervivencia, como es evidente en varias poblaciones seleccionadas y no seleccionadas de pacientes (15, 19, 25, 26). A pesar de esta mejora en el pronóstico a largo plazo, aquellos pacientes que no responden a la terapia de primera línea o recaen precozmente siguen suponiendo un reto terapéutico. En este sentido, la identificación al diagnóstico de estos casos con mala respuesta es crucial cuando se plantean esquemas terapéuticos alternativos. Estos esquemas terapéuticos alternativos se han basado tradicionalmente en una intensificación de dosis con combinaciones habituales (por ejemplo con regímenes de tipo EPOCH-R(28)) o bien en intensificación y protocolos de autotrasplante de médula ósea (MO) (por ejemplo R-ACVBP+HDT-ASCT(29)). Así, los pacientes jóvenes con IPI ajustado a la edad intermedio-alto o alto son los mejores candidatos para recibir terapias alternativas a R-CHOP-21(30). Otros factores de riesgo que se pueden utilizar para identificar pacientes para el uso de terapias con intensificación de dosis son la enfermedad bulky, la positividad del interim TEP y, de forma relevante, los perfiles moleculares(31, 32).

Adicionalmente a las terapias basadas en intensificación de dosis y/o trasplante autólogo de médula ósea, recientemente se está desarrollando el campo de las terapias dirigidas contra vías moleculares desreguladas en neoplasias linfoides. Estas nuevas terapias, actualmente en fase de ensayo clínico, toman ventaja del conocimiento de las características moleculares de los linfomas (véase clasificación molecular del LBDCG, más adelante) y tratan de inhibir vías moleculares desreguladas como consecuencia de múltiples alteraciones genéticas, como las vías de NFkB, JAK/STAT y BCR. Así, una línea de avance

actual en el tratamiento del LBDCG es el uso de fármacos inhibidores de vías recurrentemente mutadas como por ejemplo los inhibidores de BTK (ibrutinib) en pacientes con LBDCG refractario de tipo ABC(33, 34).

### **3. Caracterización clinicopatológica del LBDCG.**

#### **3a. Clasificación del LBDCG según la OMS.**

El LBDCG es un tipo de LNH cuyo diagnóstico se basa en la combinación de criterios clínicos, morfológicos, fenotípicos y moleculares. Se define en la vigente clasificación de la OMS (5) como una neoplasia linfoide de fenotipo B compuesta por células de tamaño grande (i.e el núcleo de una única célula neoplásica es el menos dos veces el de un linfocito normal o mayor que el núcleo de un macrófago), que infiltra de forma difusa el tejido.

Se distinguen hasta 12 entidades clínico-patológicas para este tipo de LNH, en función de sus particularidades clínicas, patológicas y biológicas (Tabla 1). Algunas de estas entidades tienen carácter provisional en la clasificación vigente de la OMS, debido en parte a la escasa evidencia acumulada sobre sus características clinicopatológicas. Este es el caso del Linfoma B difuso de células grandes asociado a EBV y edad avanzada. Este tipo de linfoma, inicialmente descrito como desorden linfoproliferativo B asociado a EBV y senilidad(35) se considera en parte consecuencia del deterioro inmunológico asociado con la edad avanzada y supone del 8 al 10% de los casos de LBDCG en pacientes del este de Asia, sin inmunodeficiencia previa(36, 37). Sin embargo la evidencia disponible sobre su incidencia y características clínicas, patológicas y fenotípicas en nuestro medio es limitada(38, 39).

La mayoría de los casos de LBDCG, sin embargo, no tienen características clínicas o patológicas específicas de modo que se recogen en la categoría de LBDCG B, NOS (de *No Other Specified*)(7).

Para el LBDCG NOS se reconocen tres subtipos morfológicos principales según la morfología del núcleo celular: el tipo centroblástico (núcleo de contornos más irregulares, cromatina grumosa, múltiples pequeños nucleolos), inmunoblastico (núcleo vesiculoso con nucleolo único prominente) o anaplásico (núcleo grande de contornos irregulares y morfología bizarra, forma arriñonada o en donut, nucleolo habitualmente prominente). Los diferentes subtipos morfológicos (centroblástico, inmunoblastico, anaplásico), actualmente no se diagnostican de forma reproducible entre patólogos y su significación clínica es imprecisa(40, 41). Por otro lado la estrategia terapéutica para estos subtipos morfológicos es equivalente y las diferencias en pronóstico clínico, controvertidas(40, 41).

En un intento de refinar la clasificación morfológica del LBDCG NOS se han identificado 2 subgrupos definidos molecularmente en función del perfil de expresión génica (tipo centro germinal (GCB de *Germinal Center B cell-like*) o activado (ABC, de *Activated B cell-like*)) y 3 subgrupos definidos por el perfil de expresión proteica mediante inmunohistoquímica (tipo centro germinal o GCB, tipo no-centro germinal o no-GCB y LBDCG CD5 positivo).

## **TABLA 1:**

Linfoma B difuso de célula grande (LBDCG), NOS.

Linfoma B rico en células T e histiocitos.

Linfoma B difuso de célula grande primario del SNC.

Linfoma B difuso de célula grande primario cutáneo de tipo pierna.

Linfoma B difuso de célula grande asociado con EBV y edad avanzada.

Linfoma B difuso de célula grande asociado con inflamación crónica.

Granulomatosis linfomatoide.

Linfoma B de célula grande primario mediastínico (tímico).

Linfoma B de célula grande intravascular.

Linfoma B de célula grande ALK positivo.

Linfoma plasmablástico.

Linfoma B de célula grande en el contexto de enfermedad de castleman multicéntrico HHV-8 positivo.

Linfoma primario de cavidades.

Linfoma de Burkitt.

Linfoma B inclasificable con rasgos intermedios entre Linfoma de Burkitt y Linfoma B Difuso de célula grande.

Linfoma B inclasificable con rasgos intermedios entre Linfoma de Hodgkin y Linfoma B Difuso de célula grande.

### **3b. Clasificación basada en perfiles de expresión génica.**

Aunque la clasificación clinicopatológica de la OMS provee una orientación pronóstica discreta en determinados subtipos de LBDCG (Linfoma B de célula grande primario mediastínico, linfoma B rico en células T e histiocitos, Linfoma plasmablástico, Linfoma B de célula grande en el contexto de enfermedad de Castleman multicéntrico HHV-8 positivo, Linfoma primario de cavidades, Linfoma B de célula grande ALK positivo, Linfoma de Burkitt, Linfoma B difuso de célula grande primario del SNC, Linfoma B difuso de célula grande primario cutáneo de tipo “pierna”), el grupo más extenso de LBDCG NOS muestra una heterogeneidad clínica que precisa de análisis más finos para su subclasificación.

La aparición de las tecnologías de análisis masivo de la expresión del ADN supuso un avance notable en este objetivo (42). Así, dos sistemas de clasificación complementarios permiten una subdivisión más fina de la entidad, basándose en el análisis del transcrito o grupo de transcritos (ARN mensajero) presentes en una célula en un momento concreto de diferenciación.

El primero de ellos, descrito por Alizadeh y colaboradores en 2000 (43) subdivide el LBDCG en dos grandes grupos, GCB y ABC basado en las semejanzas en la expresión de 375 genes entre las células tumorales y las células B in vitro. El primer grupo, GCB (*Germinal Center B cell-like*) muestra un perfil de expresión génica similar al de las células B normales que se encuentran en este estado de diferenciación, que se refleja también en procesos funcionales característicos de la reacción del centro germinal como la mutación somática persistente, que también ocurre en este subtipo de LBDCG



y no en el ABC (44). Genes relevantes en este fenotipo son *BCL6*, *CD10*, *LMO2*, *GCET1*, *GCET2*, *JAW-LRMP* y son los que componen la firma del LBDCG tipo CGB(45). Entre estos, *BCL6*, *GCET1* y *GCET2* son los que mayor poder discriminatorio tienen al diferenciar el LBDCG tipo GCB de los otros subgrupos moleculares (46). El segundo grupo ABC, (*Activated B Cell-like*) muestra un patrón de expresión similar al de la célula B activada in vitro tras estímulo de CD40 y BCR con antiIgM, IL-4 y/o CD40 ligando. Genes relevantes en este fenotipo son *MUM1/IRF4*, *FOXP1*, *PIM1*, entre otros(45). Modelos subsiguientes que incluyen una selección reducida de genes generan tres grupos moleculares de LBDCG, los de tipo GCB, ABC y los tipo 3 o inclasificables (~10% de los casos) (45, 46).

La ventaja del modelo, aparte de identificar genes específicos relevantes para cada subgrupo molecular de LBDCG es que existen diferencias pronósticas significativas entre los dos subgrupos principales, de modo que los casos de LBDCG tipo CGB tienen supervivencias más prologadas a largo plazo al compararlos con los de tipo ABC. Estas diferencias son independientes de las variables clínicas contenidas en el IPI (43) demostrando que la disección molecular es capaz de añadir información a la predicción basada en rasgos clínicos. A partir de este sistema se han desarrollado varios modelos de predicción pronóstica basados en la expresión de grupos seleccionados de estos genes que contienen 100(46), 27(45), 15(47) o incluso 6 genes (48).

Este sistema de clasificación basado en los perfiles de expresión, de demostrada utilidad en la era pre Rituximab, se ha validado recientemente en series de pacientes que reciben una combinación de inmunoterapia con

antraciclinas, tanto en estudios de expresión masiva(49-52) como en los modelos paucigene con una selección de genes (47, 53).

El segundo modelo de clasificación basado en los perfiles de expresión aporta información relevante de las vías funcionales desreguladas en LBDCG(54). El análisis de perfiles de expresión génica basado en grupos reproducibles identificó tres grupos de tumores complementarios a la clasificación previamente descrita GCB-ABC. Estos grupos de consenso ( de *consensus clusters*) se denominaron Ox-Phos (de fosforilación oxidativa), BCR (de receptor de células B y proliferación) y HR (de respuesta inmune (*host response*))(54). El grupo Ox-Phos muestra un incremento en la expresión de genes relacionados con la función mitocondrial, transporte de electrones, apoptosis y proteosoma. Los casos de LBDCG con la firma de HR tienen un denso infiltrado inflamatorio acompañante de células T y dendríticas semejante a la entidad reconocida como Linfoma B rico en células T e histiocitos. Los LBDCG con esta firma molecular comparten además con la variante de Linfoma B rico en células T e histiocitos características clínicas como la edad (pacientes jóvenes) y la infiltración de hígado, bazo y médula ósea(54). Los tumores del grupo BCR tienen una expresión aumentada de genes reguladores de ciclo celular, reparación del ADN, componentes de la vía de señalización del receptor de células B y factores de transcripción específicos de células B como *BCL6*. Estudios recientes indican que los LBDCG con esta firma génica son especialmente dependientes de señalización tónica desde BCR por lo que son candidatos a inhibición farmacológica de esta vía(55, 56).

### **3c. Modelos de expresion inmunohistoquimica. Correlacion imperfecta con los perfiles de expresi3n g3nica.**

La clasificaci3n molecular del LBDCG en los subtipos GCB y ABC es reproducible en la rutina diagn3stica habitual midiendo la expresi3n proteica mediante inmunohistoqu3mica de una selecci3n de los genes contenidos en estos perfiles de expresi3n. As3 se han desarrollado toda una serie de algoritmos para la valoraci3n de la expresi3n inmunohistoqu3mica de estas prote3nas que muestran un grado variable de concordancia con los sistemas de clasificaci3n basados en el perfil de expresi3n g3nica (Tabla 2). El primer algoritmo descrito por Hans y colaboradores(57) utiliza tres marcadores de IHQ (CD10, BCL6 y MUM1) y tiene una concordancia con el perfil de expresi3n g3nica (PEG) del 86%. As3 los algoritmos m3s recientes (Choi y Visco-Young) alcanzan grados de concordancia con el an3lisis de PEG pr3ximos al 90%(52, 58, 59). Estos algoritmos se utilizan actualmente como un surrogado imperfecto pero factible del an3lisis de expresi3n g3nica y su impacto pron3stico se ha validado en series independientes de pacientes tratados con R-CHOP(2, 52, 59).

**TABLA 2**

PUBLICACIÓN	NUMERO DE PACIENTES Y TIPO DE SERIE	ALGORITMO/S UTILIZADO/S	IMPACTO CLINICO	Comentarios
Hans y cols. Blood 2004	152 (CHOP, CHOP-like) (multicéntrica, retrospectiva)	Hans	GCB (76% vivos a los 5 a) VS non-GCB (34%), p< 0.001. PEG pronóstico.	
Choi y cols. CCR 2009	84 (CHOP) + 63 (R-CHOP) (multicéntrica, retrospectiva)	Hans y Choi	GCB (87% vivos a los 3 a) vs ABC (44%) p < 0.001. PEG pronóstico.	93% concordancia con PEG
Meyer y cols. JCO 2010	262 R-CHOP y CHOP-like, (multicéntrica, retrospectiva)	Hans, Choi, Muris, Nyman, Natkunam, Tally	Todos los algoritmos con efecto pronóstico (Choi y Tally mejor concordancia/impacto pronóstico). PEG pronóstico.	Choi y Tally, mayor concordancia con GEP (87% y 93% respectivamente).
Ott y cols. Blood 2010	179 (CHOP) + 173 (R-CHOP), multicéntrica. Ensayo clínico RICOVER 60	Hans	ns OS, EFS.	Morfología inmunoblástica con efecto pronóstico.
Gutierrez-García y cols. Blood 2011	157 (R-CHOP) (multicéntrica, retrospectiva)	Hans, Choi, Muris, Colomo, Tally	ns OS, PFS. PEG pronóstico.	Efecto pronóstico sólo de PEG
Montes-Moreno y cols. Blood 2011	240 (R-CHOP y CHOP-like) (multicéntrica, retrospectiva)	Choi	GCB (81% vivos a los 2 años) vs ABC (69%) p <0.05.	miRNAs predictores de OS y PFS. Score de riesgo combinado con IPI
Salles y cols. Blood 2011	1514 (RCHOP 347p, CHOP 289p, Early CHOP 878p) (multicéntrica procedente de EECC)	Hans, BCL2, Ki67, HLA-DR, CD5	ns OS en R-CHOP, ni CHOP, sólo significativo en Early CHOP	Indice combinado BCL2+Ki67+IPI
Visco y cols. Leukemia 2012	1049 (475, RCHOP, "training set", 574 RCHOP y CHOP only, "validation set")	Hans, Choi, Visco-Young	OS, PFS, Hans, Choi y Visco-Young pronósticos. PEG pronóstico.	Visco-Young 3 marcadores, 92.6% concordancia con PEG.

### 3d. Otros marcadores inmunohistoquímicos y su utilidad en la clasificación diagnóstica del LBDCG.

Determinadas entidades clínico-patológicas dentro del espectro del LBDCG muestran un fenotipo característico. Este es el caso del linfoma plasmablastico. Este subtipo de Linfoma B se considera una entidad clinicopatológica específica en la actual clasificación de la OMS, debido a sus peculiares rasgos clínico-patológicos(6, 7). Desde el punto de vista fenotípico se caracteriza por mostrar un fenotipo semejante al de las células plasmáticas, con pérdida de marcadores de línea B como CD20 y PAX5 y adquisición de marcadores de diferenciación terminal como CD138, CD38 e IRF4/MUM1(6, 60). El inicio de esta diferenciación terminal en células B normales está finamente regulado por el eje PAX5-PRDM1/Blimp1, de modo que la sobreexpresión de la proteína PRDM1/Blimp1 inicia el programa de diferenciación plasmocelular(61, 62). La

sobreexpresión de PRDM1/Blimp1 en neoplasias linfoides de fenotipo B se asocia, de forma análoga a las células B normales, con diferenciación plasmocelular y se encuentra en casos de mieloma múltiple, plasmocitoma, linfoma B linfoplasmacítico y linfomas plasmablásticos(63). De forma semejante a PRDM1/Blimp1, XBP1 es un factor de transcripción esencial para la diferenciación plasmocelular y puede actuar de forma secuencial o independiente a PRDM1/Blimp1 en la inducción de este fenotipo(64, 65). La expresión de XBP1 se ha verificado en tejidos de neoplasias de células plasmáticas, linfomas plasmablásticos y un subgrupo de Linfomas B de células grandes por dos grupos de investigación independientes(66, 67). La expresión de estas proteínas relacionadas con un estado de diferenciación específico puede ser de utilidad en la subclasificación diagnóstica de neoplasias linfoides, que se basa, en parte, en el estado de diferenciación o fenotipo de la célula neoplásica en referencia al patrón de diferenciación de las células B normales(6, 7).

#### **4. Identificación de nuevos marcadores moleculares a partir de estudios de expresión. Perfiles de expresión de microARNs.**

Los perfiles de expresión de genes codificantes han ampliado las posibilidades de clasificación del LBDCG y actualmente la clasificación de la OMS reconoce las variantes moleculares GCB y ABC. Existen otros tipos de ácidos ribonucleicos (ARN), en este caso no codificantes, denominados microARNs cuyo perfil de expresión puede ser potencialmente utilizado en la subclasificación de las neoplasias linfoides.

#### **4a. microARNs. Definición, estructura y función.**

Los microARNs son una clase de ARNs cortos (de aproximadamente 22 nucleótidos) que modulan la expresión génica, alterando la traducción o induciendo la degradación del ARN mensajero mediante su unión a la región 3' no codificante (3'UTR) del ARNm diana(68). Se estima que los microARNs regulan del 10 al 30% de los genes codificantes de proteínas y se han identificado en torno a 1000 especies diferentes de microARNs en células B de humanos(69). Así, la expresión de este tipo de ARNs no codificantes es ubicua en las diferentes especies de mamíferos y otros tipos celulares y estudios posteriores han demostrado la existencia de microARNs específicos de tipo celular y/o estado de diferenciación, sugiriendo cierta especificidad de tejido en la regulación de la expresión de estos microARNs(70-72).

#### **4b. microARNs en neoplasias linfoides.**

La relación del perfil de expresión de microARNs con diferentes fases de maduración de la célula B normal ha sido bien establecida. Por ejemplo, el miR-150 se encontró inicialmente en células B maduras, donde regula la expresión de genes relacionados con diferenciación linfoides B como C-MYB(73). Otros microARNs como miR-223 están sobreexpresados en los estadios de célula B naive y de memoria, en comparación con las células B del centro germinal. La expresión de miR-223 en células naive inhibe la expresión de factores de transcripción que habitualmente se expresan a altos niveles en las células B centrogerminal normal como LMO2(74).

Esta relación entre la expresión de microARNs y estadios de diferenciación específicos se reproduce parcialmente en las neoplasias linfoides de modo que

se encuentran grupos de miRNAs diferencialmente expresados entre distintos subtipos moleculares de LBDCG como el GCB y el ABC, en estudios realizados en líneas celulares(75). Así los microARNs son marcadores de diferenciación celular.

Además de su papel en diferenciación celular se ha encontrado que microARNs específicos tienen un papel oncogénico en neoplasias linfoides. Así, el miR-155, producto del gen BIC, se sobreexpresa en varios tipos de neoplasias linfoides B (linfoma de Hodgkin y linfomas B de célula grande) y su expresión transgénica en ratones provoca neoplasias linfoides B(76). Otro ejemplo lo constituye el oncomir-21 cuya sobreexpresión en ratones transgénicos conduce a una neoplasia linfoides de fenotipo pre-B dependiente de la sobreexpresión mantenida de miR-21(77). Así, algunos miRNAs se convierten en dianas terapéuticas cuya inhibición farmacológica podría controlar la proliferación neoplásica.

## **II HIPOTESIS Y OBJETIVOS**

A pesar de los avances en la quimioterapia de combinación con antraciclinas e incluyendo inmunoterapia con anticuerpos monoclonales (i.e antiCD20), existe aún un grupo significativo de pacientes (30-40%) con LBDCG, que permanece refractario a la terapia o falla precozmente a la misma(15, 16). La estimación del pronóstico de estos pacientes tratados con quimioinmunoterapia se basa fundamentalmente en criterios clínicos. Sin embargo hay evidencia suficiente

de que los rasgos biológicos de la neoplasia condicionan su conducta y pueden ser utilizados también para predecir el curso clínico post-tratamiento.

La **hipótesis** de esta tesis doctoral es que la expresión de determinados marcadores biológicos en las muestras tumorales de Linfoma B Difuso de célula grande tiene un impacto en la conducta biológica de estas neoplasias y, por consiguiente, en el pronóstico clínico de los pacientes, en relación con supervivencia global y respuesta a la terapia habitual.

El **objetivo** fundamental de la presente tesis doctoral es doble. Por un lado se pretende la identificación de marcadores biológicos de utilidad diagnóstica y pronóstica en Linfoma B Difuso de Células Grandes. Por otro lado se trabaja en la descripción de entidades clinicopatológicas concretas (i.e Linfoma Plasmablastico y Linfoma B Difuso de Célula Grande asociado a EBV y edad avanzada).

### **III RESULTADOS**

Los resultados de esta investigación han sido publicados en cuatro originales en revistas de ámbito internacional. Se adjuntan con este documento(1-4) y se exponen a continuación.

**GCET-1 es un marcador restringido a un subgrupo de linfomas B derivados del centro germinal. (de “Gcet1 (centerin), a highly restricted marker for a subset of germinal center-derived lymphomas”)(1)**



***GCET-1 (SERPINA9)* se sobreexpresa en muestras de linfoma B Folicular en comparación con muestras de hiperplasia linfoide B reactiva.**

Los datos de expresión de cDNA mediante microarrays de 33 muestras de Linfoma Folicular (LF) mostraron una sobreexpresión del ARNm de *GCET1* de 2.21 veces mayor en comparación con 3 muestras de ganglio linfático reactivo (Figura 1). Con la excepción de las subunidades de histonas la expresión de *GCET1* fue, en números absolutos, la mayor de todos los genes incluidos en esta firma molecular de linfoma folicular, mayor incluso que la de otros genes asociados con un fenotipo centrogerminal como *CD10 (MME)*.

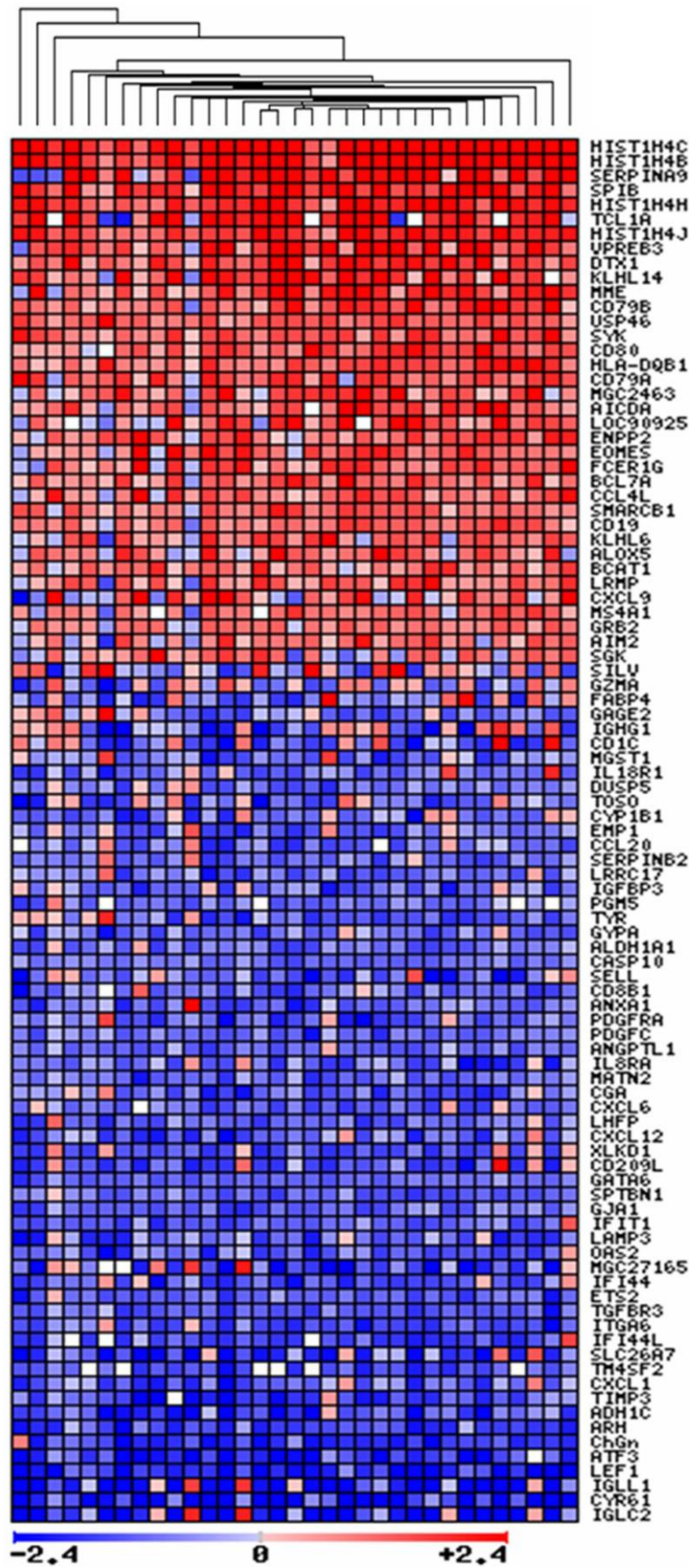
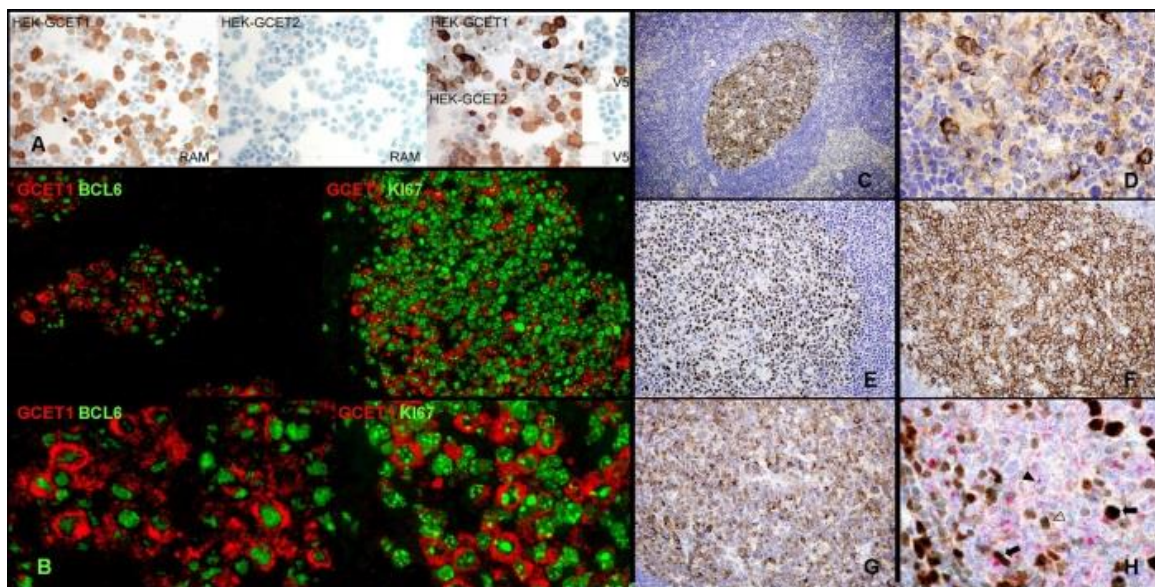


Figura 1: Firma molecular del linfoma B folicular. Imagen mostrando el perfil de expresión génica de 33 casos de linfoma folicular normalizados con 3 casos de hiperplasia linfoide reactiva ganglionar. El color rojo denota un nivel de expresión alto del gen en comparación con el tejido normal; el color azul indica un nivel de expresión bajo. Con la excepción de las subunidades de histonas, *GCET1* (*SERPINA9*) se expresa en números absolutos más que el resto de genes de esta firma molecular, incluidos genes relacionados con el estado centrogerminal establecidos como *MME* (*CD10*) y *BCL6* (no mostrado), así como nuevos marcadores centrogerminales como *KLHL6* y *DTX1*(78).

**La proteína GCET1 se expresa en células B del centro germinal y neoplasias linfoides relacionadas.**

Tras la generación de un anticuerpo monoclonal específico (anti-GCET1 moAb) de la proteína derivada del gen *GCET1* (véase material y métodos en original de referencia(2)) se procede a la caracterización de la expresión en tejidos linfoides normales y patológicos fijados en formol e incluidos en parafina (FFIP). La proteína GCET1 se expresa en tejido linfoide, específicamente en células B del centro germinal. Se encuentra en los centros germinales de la amígdala palatina, ganglio linfático y pulpa blanca esplénica. No se observó expresión en el timo normal o en otros tejidos fetales o adultos estudiados. En las células B del centro germinal la proteína GCET1 se identifica en el citoplasma de la célula, con un patrón granular y frecuentemente con un halo perinuclear o punto (tinción de Golgi). En el centro germinal identifica centroblastos (células grandes no hendidas) y centrocitocitos grandes (células grandes hendidas) pero no centrocitocitos pequeños (células pequeñas hendidas) u otras células accesorias. No se observa una clara diferencia en la expresión al comparar la zona oscura (con alta fracción proliferativa) con la zona clara del

centro germinal. Sólo de forma excepcional se identificaron aisladas células grandes en la zona del manto, positivas con anti-GCET1. Al comparar la tinción de GCET1 con la inmunotinción para BCL6 y CD10 en casos de hiperplasia folicular linfoide reactiva se observa que anti-GCET1 identifica una subpoblación de células positivas para CD10 y BCL6. Utilizando una técnica de doble tinción con inmunofluorescencia indirecta e inmunoperoxidasa se observa que GCET1 se expresa en una amplia mayoría de células positivas para BCL6. Sin embargo algunas células BCL6 positivas son negativas con anti-GCET1. La doble inmunotinción con antiGCET1 y un marcador de proliferación (Ki-67) demostró que todas las células GCET1 positivas están en fase proliferativa, mientras que unas pocas células proliferantes no expresan GCET1. La tinción doble inmunoenzimática con GCET1 y MUM1/IRF4 demostró un patrón mutuamente excluyente con una minoría de células positivas para ambos marcadores (dobles positivas GCET1-MUM1/IRF4) (véase figura 2).



## Figura 2. Validación de GCET1 y caracterización en folículos linfoides reactivos.

(A, B) Preparaciones de citocentrífuga con células HEK transfectadas. La línea celular HEK transfectada con ADNc de *GCET1* muestra una tinción específica con el monoclonal antiGCET1 (clon RAM). Sin embargo, la misma línea con el ADNc de *GCET2* es negativa con el monoclonal antiGCET1. (C-F) Doble inmunofluorescencia combinada con tinción enzimática en folículos reactivos. *GCET1* se expresa en una proporción amplia de células positivas para BCL6 mientras que una minoría de células positivas para BCL6 fueron negativas para *GCET1* (C-D). La doble inmunotinción para *GCET1* y Ki67 demostró que todas las células *GCET1* positivas expresan Ki67 mientras que una minoría de células positivas con Ki67 eran negativas con *GCET1* (E-F). (G-H) La inmunotinción del folículo reactivo con el monoclonal antiGCET1 está restringida a células B del centro germinal. Se observa una tinción citoplásmica y granular en centroblastos y centrocitos grandes pero no en centrocitos pequeños. (I-K). Se muestra el mismo centrogerminal teñido con anticuerpos frente a *GCET1*, BCL6 y CD10. El monoclonal frente a *GCET1* muestra un patrón de tinción heterogéneo, identificando una subpoblación de células que coexpresan CD10 y BCL6. (L) La doble tinción inmunoenzimática con *GCET1* (rojo) y MUM1/IRF4 (marrón) demuestra una subpoblación minoritaria de células que coexpresan *GCET1* y MUM1/IRF4 (flechas rojas). Las flechas azules y verdes identifican células positivas sólo para *GCET1* y MUM1/IRF4, respectivamente.

La expresión de *GCET1* se testó en muestras de 369 pacientes con linfoma. Los resultados se resumen en la tabla 3. *GCET1* se expresa en un gran número de neoplasias linfoides B, especialmente en aquellas que derivan de células B del centro germinal (82 de 89 (92%) linfomas B foliculares y 7 de 19 (37%) linfomas de células de Burkitt (LB). Algunos LF mostraban aisladas células positivas para *GCET1*. Las células positivas se encontraron en los centros germinales neoplásicos y en la zona marginal, mientras que las células B interfoliculares fueron usualmente negativas (figura 3). En los casos de LB

positivos la tinción fue citoplásmica y difusa (en la mayoría de las células neoplásicas). Sin embargo algunos casos de LF y LB fueron negativos. Ninguno de los otros linfomas B de célula pequeña testados (leucemia/linfoma linfocítico, 20 casos, linfoma de la zona marginal esplénico, 19 casos, linfoma del manto, 19 casos) mostraron positividad para GCET1 excepto aislados centros germinales reactivos rodeados por la neoplasia.

Aproximadamente la mitad de los casos de Linfoma B de célula grande (34 de 72, 47%) fueron positivos para GCET1. En el 40% de los casos positivos la tinción fue difusa e intensa en más del 50% de la celularidad neoplásica. Sin embargo en el 60% de los casos la tinción fue heterogénea, con una población de células positivas menor del 50% de la celularidad neoplásica (figura 3). Al subclasificar los casos de LBDCG en los subtipos GCB y no-GCB según el algoritmo de Hans y cols(57) se observó que los casos de tipo GCB son más frecuentemente positivos (GCB: 21 de 31 positivos, 68%, no-GCB: 3 de 21 positivos, 14%) aunque la concordancia no es perfecta.

Más de la mitad de los casos (7 de 13 casos, 54%) de linfoma B rico en células T e histiocitos fueron positivos para GCET1. En estos casos la tinción fue intensa y selectiva de las células neoplásicas grandes. En los casos de Linfoma de Hodgkin, GCET1 reconoció prácticamente todos los casos de linfoma de Hodgkin de tipo predominio linfocítico nodular (38 de 40 casos, 95%), un subgrupo de linfomas de Hodgkin de tipo rico en linfocitos (2 de 15 casos, 13%) pero ningún caso de los del tipo esclerosis nodular o celularidad mixta (56 casos en total). En los casos de linfoma de Hodgkin de tipo predominio linfocítico nodular la tinción fue intensa y específica de las células de tipo PL

(Predominio Linfocítico, anteriormente conocidas como LH). Se identificaron aislados blastos B positivos para GCET1. Ninguno de los 18 casos de Linfoma T periférico NOS evaluados fue positivo con antiGCET1.

**TABLA 3. Expresión inmunohistoquímica de GCET1 en los principales tipos de linfoma.**

<b>DIAGNÓSTICO</b>	Numero de casos estudiados	<b>GCET1+ (%)</b>	Comentarios
<b>Linfomas de células B</b>			
Leucemia linfocítica crónica/ linfoma linfocítico (LLC/LLP)	20	0 (0%)	
Linfoma esplénico de la zona marginal (LSZM)	8	0 (0%)	
Linfoma de células del manto clásico (LCM)	19	0 (0%)	
Linfoma de Burkitt (LB)	19	7 (37%)	
Linfoma folicular (LF)	89	82 (92%)	
Linfoma B Difuso de células grandes (LBDCG)	72	34 (47%)	GCB: 21/31+; NO-GCB: 3/21+.
Linfoma B rico en células T e histiocitos	13	7 (54%)	
<b>Linfoma de Hodgkin</b>			
Linfoma de Hodgkin, predominio linfocítico nodular (LHPLN)	40	38 (95%)	
Linfoma de Hodgkin clásico rico en linfocitos (LHCRL)	15	2 (13%)	
Otros linfomas de Hodgkin clásico (celularidad mixta y esclerosis nodular)	56	0 (0%)	
<b>Linfoma de células T</b>			
Linfoma T periférico (LTP) NOS	18	0 (0%)	

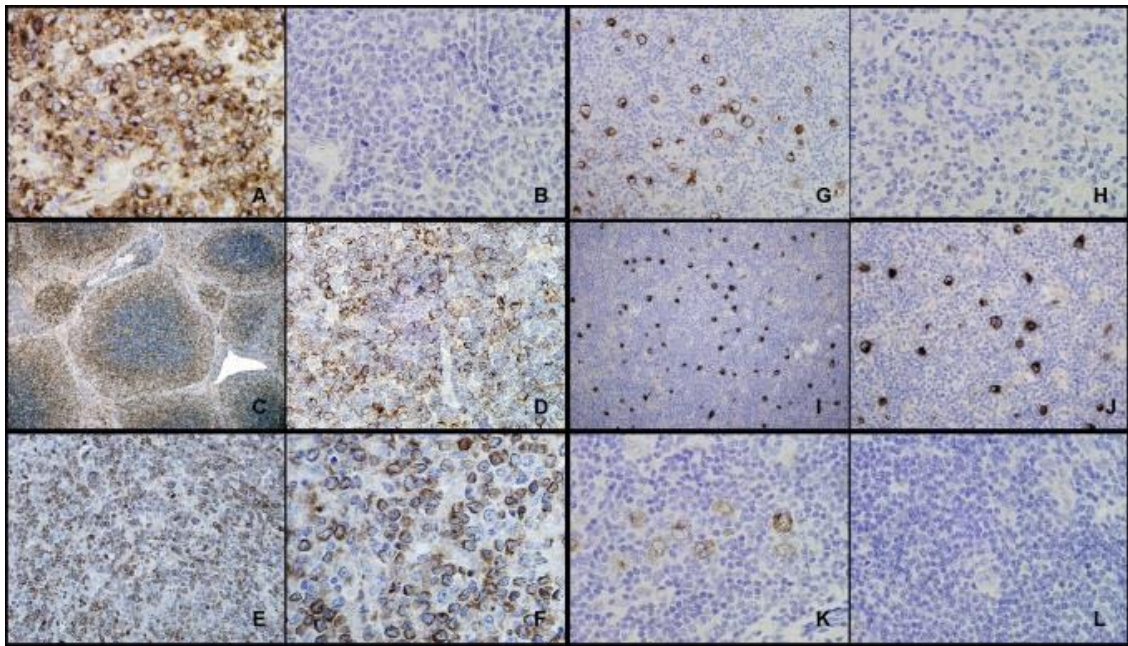


Figura 3. Expresión inmunohistoquímica de GCET1 en los principales tipos de Linfoma B.

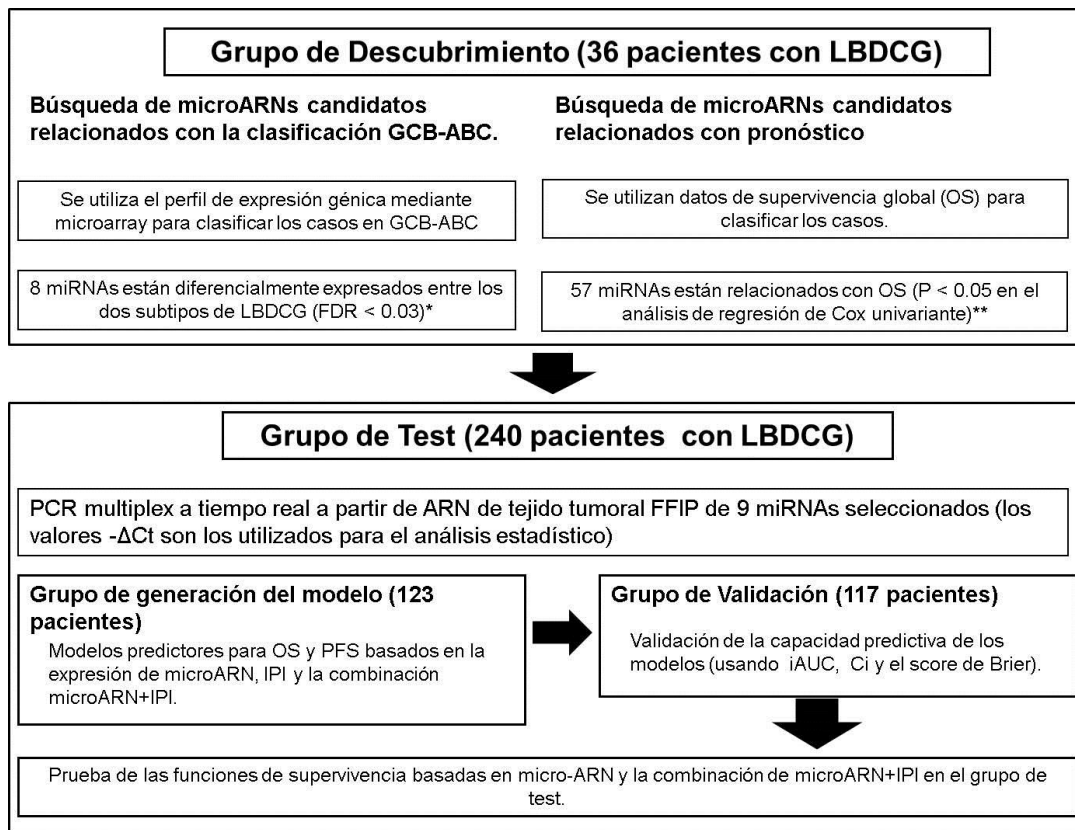
(A-D) Expresión de GCET11 en linfoma folicular. Las células positivas se localizan en el centro germinal (A), así como en áreas de diferenciación marginal (B) y áreas difusas (C). A mayor aumento (D) se identifica un patrón de tinción difuso y heterogéneo en la población neoplásica. (E,F) Expresión de GCET1 en linfoma de Burkitt. En los casos de linfoma de Burkitt positivos para GCET1 la tinción es difusa con una localización citoplásmica característica (E). Sin embargo algunos casos de LB fueron negativos (F). (G, H) Expresión de GCET1 en LBDCG. (I) Expresión de GCET1 en Linfoma B rico en células T e histiocitos. En los casos positivos GCET1 tiñe selectivamente las células neoplásicas. El patrón de tinción es semejante al observado en linfoma de Hodgkin de tipo predominio linfocítico nodular (J) y en los casos positivos de linfoma de Hodgkin clásico rico en linfocitos (K). Sin embargo, un subgrupo de linfomas de Hodgkin clásico rico en linfocitos (L) y todos los demás casos de linfoma de Hodgkin clásico (esclerosis nodular y celularidad mixta) fueron negativos para GCET1.



**Expresión de microARNs en linfoma B difuso de células grandes tratado con quimioinmunoterapia. (de “miRNA expression in diffuse large B-cell lymphoma treated with chemoimmunotherapy”)(2)**

Los microARNs sirven de excelentes biomarcadores para el diagnóstico y pronóstico en cáncer(79-81), incluyendo las neoplasias hematolinfoides(82-84). Adicionalmente se ha demostrado que pueden servir para identificar diversos estadios de diferenciación(72, 74, 85) o estar relacionados con la transformación maligna(76, 86) y la sensibilidad o resistencia a fármacos(87).

El principal objetivo de este estudio fue la identificación de una firma de microARNs asociada con el pronóstico clínico de pacientes con LBDCG tratados de forma homogénea con R-CHOP, utilizando muestras tumorales al diagnóstico fijadas en formol e incluidas en parafina (FFIP). Adicionalmente se investigó si el análisis de expresión de microARNs permitía distinguir miRNAs diferencialmente expresados entre las dos variante moleculares de LBDCG, es decir tipo CGB o de célula B activada (ABC). El diseño experimental se resume en la figura 4.



**Figura 4. Diseño experimental.**

La serie de pacientes se divide en dos grupos: un grupo de descubrimiento (36 pacientes con tejido tumoral congelado disponible para análisis de expresión de genes y microARNs utilizando *microarrays*) y un grupo de test (240 pacientes con tejido tumoral FFIP de la muestra diagnóstica). El grupo de test se subdivide en un grupo de generación del modelo (123 pacientes) y un grupo de validación (117 pacientes). \* la subclasificación molecular de los casos de LBDCG se hace según el algoritmo de Wright et al(45). \*\* la relación entre la firma de miRNAs y supervivencia global se basa en un análisis de regresión de Cox univariante utilizando SignS(88).

### **Características clínicas de la serie a estudio.**

En la tabla 4 se muestra un resumen de las características clínicas de la serie de pacientes incluidos en este estudio. Se recogieron los datos clínicos e histopatológicos de un total de 258 pacientes. La mediana de seguimiento para

todos los pacientes fue de 21,3 meses. La mediana de seguimiento de los pacientes vivos en el último momento de seguimiento fue de 27 meses (rango 2-105 meses). La supervivencia global estimada a los 2 años fue de 74,7%  $\pm$  3% y el tiempo estimado libre de progresión de 67,5%  $\pm$  3%. Ya que el número de eventos en la mediana de seguimiento supone el 75% (44 de 5) y 92% (66 de 77) del total de eventos para supervivencia global y tiempo libre de progresión, respectivamente, se consideró que la serie de pacientes era adecuada para el análisis estadístico, a pesar del limitado tiempo de seguimiento.

No se encontraron diferencias significativas entre las variables del IPI en los grupos de generación del modelo y el de validación, con la excepción de la edad. Todos los componentes del IPI fueron pronósticos para supervivencia global (OS, de *overall survival*) en el análisis univariante y todos excepto la edad para supervivencia libre de progresión (PFS de *progression free survival*). Los riesgos relativos e intervalos de confianza para cada variable se muestran en la tabla 4 y las estimaciones de supervivencia de acuerdo con el IPI en la figura suplementaria 1 del original adjunto(2).

**Tabla 4: Características clínicas de la serie.**

	GRUPO DE DESCUBRIMIENTO	GRUPO DE TEST (240 PACIENTES)			
		GENERACION	VALIDACION	Riesgo relativo de muerte (OS) (95% CI); p valor	Riesgo relativo de progresión (PFS) (95% CI); p valor
Número de pacientes	36	123	117		
Factores IPI					
Edad					
≤60 años	13	61	35		
> 60 años	23	62	79		
Estadio					
I-II	8	55	43		
III-IV	28	68	65		
LDH					
bajo	10	56	28		
alto	26	67	55		
Estado funcional (PS)					
Ambulatorio (0-1)	29	90	56		
No Ambulatorio (2-4)	7	33	22		
Afectación extraganglionar					
≤ 1 sitio	28	96	57		
> 1 sitio	8	27	21		
IPI score					
Bajo riesgo (0,1)	6	46	33		
Riesgo Bajo-intermedio (2)	10	24	25		
Riesgo intermedio-alto (3)	12	29	26		
Alto riesgo (4,5)	8	22	28		

Tabla 4. Características clínicas de la serie. Se muestra la distribución de factores del IPI. El test de  $\chi^2$  se utilizó para testar las diferencias en las proporciones de factores pronósticos individuales entre las series de generación y validación. El riesgo relativo de los eventos (OS y PFS) estimado mediante un análisis de regresión de Cox univariante se muestra para cada factor del IPI en el grupo de test (240 pacientes).

### **Confirmación de la capacidad pronóstica de la clasificación según la célula de origen (GCB o ABC) basada en inmunohistoquímica.**

Se realizó inmunohistoquímica en los 240 casos con tejido FFIP disponible. La mayoría de los casos (232 de 240) se pudieron clasificar en los subtipos GCB o ABC según el algoritmo publicado por Choi y cols. que utiliza cinco marcadores (i.e GCET1, CD10, BCL6, MUM1, FOXP1)(58). Ciento seis (106) casos se clasificaron como tipo GCB (46%) y 126 como tipo ABC (54%). La supervivencia global estimada a 2 años para el subgrupo de casos de LBDCG ABC fue de 69,8%  $\pm$  4,5%, significativamente inferior que la de los casos de tipo GCB (81, 4%  $\pm$  4,3%,  $p < 0.05$ ). Las diferencias en supervivencia libre de

progresión también son significativas entre ambos grupos ( $60,7\% \pm 4,7\%$  para el subtipo ABC frente a  $75,6\% \pm 4,6\%$  para el tipo GCB,  $p < 0,05$ ). Véase figura suplementaria 1 en original de referencia(2).

### **Identificación de una firma de microARNs relacionada con la célula de origen.**

29 casos se estudiaron mediante *arrays* de expresión génica y, utilizando el set de genes propuesto por Wright y cols.(45) 11 casos fueron clasificados como de tipo GCB y 18 casos como de tipo ABC. Ocho microARNs se encontraron diferencialmente expresados entre estos subtipos (FDR  $< 0.03$ , véase tabla suplementaria 2 en original de referencia(2)). Así, miR-331, miR-151, miR-28, miR-454-3p están sobreexpresados en los casos de LBDCG de tipo GCB mientras que miR-222, miR-144, miR-451 y miR-221 están sobreexpresados en el subtipo ABC. Se buscaron los genes diana que potencialmente están bajo la regulación de estos microARNs (véase material y métodos en original de referencia(2)). Pares de regulación relevantes incluyen miR151-5p y miR28-5p que tienen como diana a FOXP1, miR-144 y LRMP1 y miR-451 y MME (CD10). Después de aplicar un análisis de enriquecimiento en grupos de genes (*gene set enrichment* o GSEA (GSEA v2)(89)) se observa cómo la firma de la célula B centrogerminal (esto es, genes relacionados con la diferenciación centrogerminal) es el principal grupo de genes que pueden estar siendo regulados por los microARNs diferencialmente expresados entre los subtipos GCB y ABC (véase figura 5 y tabla 2 suplementaria del original de referencia(2)).

## A

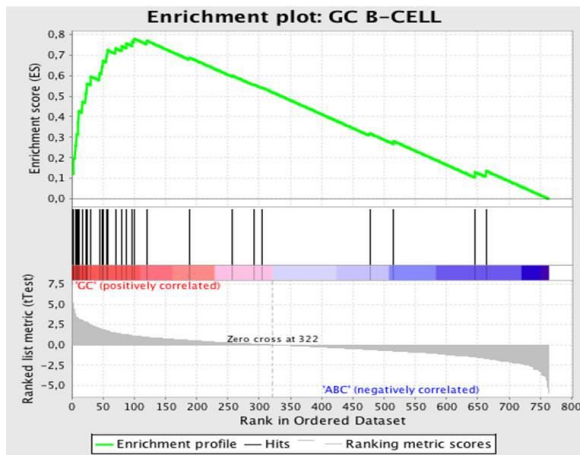
Systematic Name	p-value	Corrected p-value	FCAbsolute	regulation
hsa-miR-222	0,00103781	0,006226859	2,6027915	down GC-type
hsa-miR-144	0,00217492	0,010439598	4,596235	down GC-type
hsa-miR-451	0,00554366	0,02217463	3,285324	down GC-type
hsa-miR-221	0,00920023	0,02936512	2,5527115	down GC-type
hsa-miR-148a	0,01491853	0,036397338	2,3123398	down GC-type
hsa-miR-331	9,27E-07	2,23E-05	2,613358	up GC-type
hsa-miR-151	3,32E-06	3,99E-05	2,8651066	up GC-type
hsa-miR-28	5,31E-04	0,004248995	2,26739	up GC-type
hsa-miR-454-3p	0,00978837	0,02936512	2,2144535	up GC-type
hsa-miR-210	0,01516556	0,036397338	2,5904675	up GC-type
hsa-miR-183	0,01981301	0,043228388	2,6924877	up GC-type
hsa-miR-138	0,02459794	0,049195886	4,409964	up GC-type

microRNAs differentially expressed between DLBCL subtypes after t-test (using FDR (Benjamini-Hochber correction))

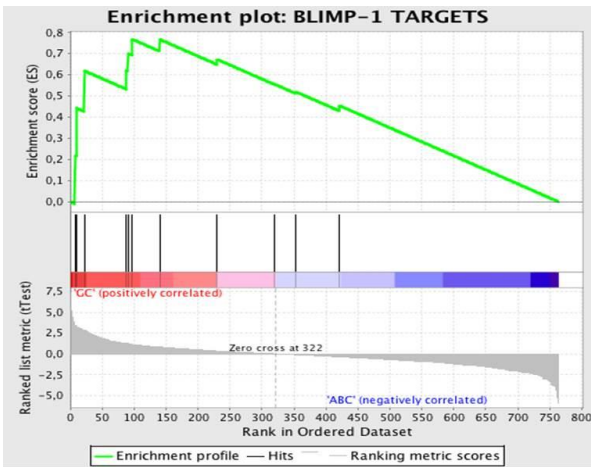
## B

miRNA-mRNA Pairs in GCvsABC				
miRNAs Down	mRNA_Up	mRNA_Unchanged	mRNA_Down	Total
hsa-miR-222	1 FDZRN4	105	3	109
hsa-miR-144	2 ANUBL1, LRMP	170	0	172
hsa-miR-451	3 METAP2, MGC72075, MME	114	0	117
hsa-miR-221	0	107	1	108
hsa-miR-148a	1 U464_HUMAN	105	3	109
miRNAs Up	mRNA_Up	mRNA_Unchanged	mRNA_Down	Total
hsa-miR-331-3p	0	104	1 DBN1	105
hsa-miR-151-5p	1	102	4 ADAM8, C10orf116, CYB5R2, FOXP1	107
hsa-miR-28-5p	4	124	4 C3orf6, SLCPO4A1(2 pairs), FOXP1	132
hsa-miR-454	1	130	0	131
hsa-miR-210	0	96	3 COL9A3, CYB5R2, DBN1	99
hsa-miR-183	0	121	1 CPNE3_HUMAN	122
hsa-miR-138	0	120	1 MPST	121

C



	ANUBL1	ANUBL1	ANI, ubiquitin-like, homolog (Xenopus laevis)
	MRE	MRE	membrane metallo-endopeptidase (neutral endopeptidase, enkephalinase)
	SYPL4	SYPL4	synaptotagmin-like 4 (granophilin-3)
	LRMP	LRMP	lymphoid-restricted membrane protein
	MYBL1	MYBL1	v-myb myeloblastosis viral oncogene homolog (avian)-like 1
	FLZ0366	FLZ0366	-
	STAG3	STAG3	stromal antigen 3
	BRG1	BRG1	-
	PZRY12	PZRY12	purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 12
	SPIRK2	SPIRK2	serine peptidase inhibitor, Kazal type 2 (acrosin-trypsin inhibitor)
	EPST11	EPST11	epithelial stromal interaction 1 (breast)
	CD38	CD38	CD38 molecule
	LFP	LFP	LIM domain containing preferred translocation partner in lipoma
	MNS1	MNS1	meiosis-specific nuclear structural 1
	HOP	HOP	-
	FRD3	FRD3	formin homology 2 domain containing 3
	KLRK4	KLRK4	killer cell lectin-like receptor subfamily C, member 4
	CD180	CD180	CD180 molecule
	RGS13	RGS13	regulator of G-protein signalling 13
	ATP9A1	ATP9A1	ATPase, aminophospholipid transporter (APLT), class I, type 9A, member 1
	MYO9A	MYO9A	myosin IXA
	SYNE2	SYNE2	spectrin repeat containing, nuclear envelope 2
	FRZB	FRZB	frizzled-related protein
	DCN	DCN	decorin
	KCNN3	KCNN3	potassium intermediate/small conductance calcium-activated channel, subfamily N, member 3
	ST14	ST14	suppression of tumorigenicity 14 (colon carcinoma)
	DFNA5	DFNA5	deafness, autosomal dominant 5
	ANXA6	ANXA6	annexin A6
	SUSD3	SUSD3	sushi domain containing 3



	LRMP	LRMP	lymphoid-restricted membrane protein
	MYBL1	MYBL1	v-myb myeloblastosis viral oncogene homolog (avian)-like 1
	BRD1	BRD1	-
	CD180	CD180	CD180 molecule
	MS4A1	MS4A1	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 1
	RGS13	RGS13	regulator of G-protein signalling 13
	HLA-DRB1	HLA-DRB1	major histocompatibility complex, class II, DR beta 1
	CD22	CD22	CD22 molecule
	CD52	CD52	CD52 molecule
	FOUZAF1	FOUZAF1	FOU domain, class 2, associating factor 1
	ACTB	ACTB	actin, beta

NAME	SIZE	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val
GC B-CELL	29	0.7797555	2.02472	0	3.19E-04
BLIMP-1 TARGETS	11	0.76809406	1.68849	0.01104972	0.02698066
IRF3 TARGETS	15	0.40516844	1.2319682	0.18253969	0.4893543
GC TH-CELL	31	0.33119276	0.95444435	0.5114943	0.87503886
TCELL CYTOKINE SIGNALLING	19	0.32336858	0.9172284	0.59921414	0.76017994
CD8 T-CELL DIFFERENTIATION	7	0.41781434	0.8806342	0.5952381	0.6849858
NK-CELL PTH	6	0.40559143	0.753481	0.74454147	0.74337876

## Figura 5. Identificación de una firma de microARNs relacionada con la célula de origen.

Ocho microARNs se encontraron diferencialmente expresados entre los subtipos GCB y ABC (A). Adicionalmente los genes diferencialmente expresados entre los subtipos GCB y ABC se filtraron usando MiRBase (miRBase v11.0, (MICROCOSM) y se seleccionaron aquellos que son considerados dianas potenciales de alguno de los microARNs diferencialmente expresados (B). Se realizó un análisis de *Gene Set Enrichment* (GSEA v2) con este grupo de genes utilizando como clasificadores gene sets relacionados con linfoma (BIOCARTA-lymphoma curated gene sets) (C).

### **Identificación de microARNs relacionados con pronóstico en LBDCG y generación de un modelo pronóstico basado en la expresión de microARNs.**

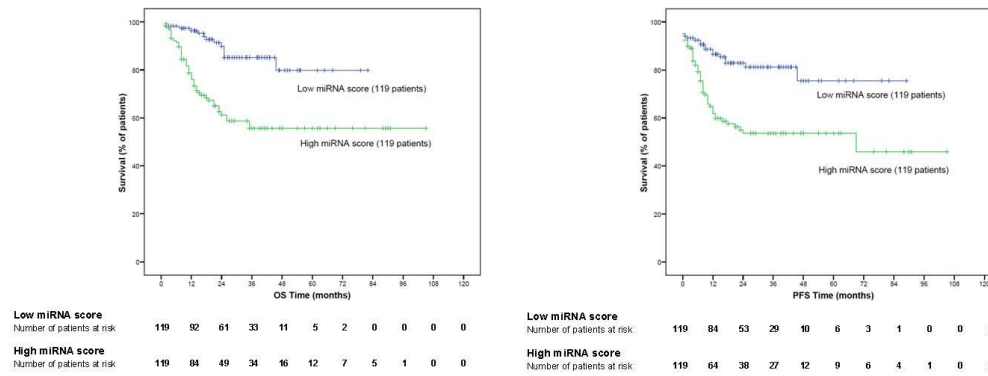
Con la intención de identificar microARNs relacionados con pronóstico pero no asociados con las firmas previamente descritas en relación con el subtipo GCB o ABC se realizó un análisis de Cox univariante utilizando Signs(88) con los datos de expresión de microARNs de 36 casos de LBDCG del set de descubrimiento. 57 microARNs se correlacionan con supervivencia global ( $p < 0.05$ ). Ninguno de estos microARNs forma parte de la firma asociada con la célula de origen sugiriendo que este método es complementario al previamente utilizado.

Tras los análisis previamente descritos se seleccionó un grupo de 9 microARNs de los que se midió su expresión mediante PCR a tiempo real en la serie de test de 240 pacientes con tejido FFIP disponible. Siete de estos microARNs (miR-221, miR-222, miR-331, miR-451, miR-28, miR-151 y miR-148a) fueron



identificados en relación con la firma GCB-ABC y dos microARNs (miR- 93 y miR-491) se obtuvieron del análisis de Cox univariante en relación con OS.

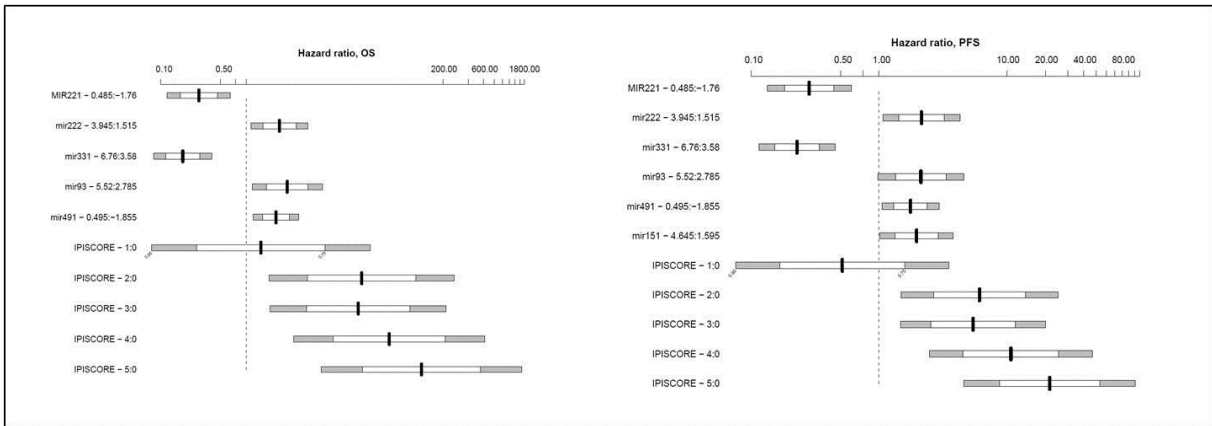
Mediante análisis de regresión de Cox se generaron tres modelos de supervivencia independientes, basados en el score IPI, la expresión de microARNs (de los 9 microARNs seleccionados) y la clasificación en GCB y ABC mediante inmunohistoquímica. Estos modelos se generaron tanto para OS como para PFS en la serie de generación del modelo. El modelo basado en la expresión de microARNs tomado como variable continua muestra capacidad pronóstica tanto para supervivencia global como para supervivencia libre de progresión. Su capacidad predictiva en el grupo de validación se confirmó con tres métodos estadísticos distintos, incluyendo el área bajo la curva ROC, el índice de concordancia y el score de Brier (véanse los detalles en el material suplementario del original de referencia(2)). Para visualizar el impacto pronóstico se generaron curvas de Kaplan-Meier utilizando toda la serie de pacientes (grupo de test de 240 pacientes). Tras estratificar los casos utilizando la mediana del score continuo obtenido de los modelos basados en la expresión de microARNs los pacientes se clasificaron en dos grupos, un grupo con un bajo score de microARNs (por debajo de la mediana) y un grupo con un score alto de microARNs (sobre la mediana). Las diferencias entre ambos grupos de pacientes en cuanto a supervivencia global y supervivencia libre de progresión fueron significativas ( $p$  log Rank < 0.001). Véase figura 6.



**Figura 6. Representación de Kaplan-Meier de los modelos de supervivencia**

**basados en la expresión de microARNs.** Se han calculado los scores de supervivencia basados en la expresión de microARNs para cada paciente en el grupo de test a partir de la función de supervivencia obtenida en el set de generación del modelo. Tras estratificar con la mediana se generan las curvas de Kaplan-Meier para OS y PFS (test de log-rank,  $p < 0.001$  para OS y PFS).

Tras analizar los tres modelos generados (basados en IPI, microARNs y clasificación GCB- ABC según inmunohistoquímica), sólo la combinación de la expresión de microARNs e IPI era significativamente mejor que los modelos individuales, tanto para supervivencia global como supervivencia libre de progresión ( $\chi^2 < 0.05$  para todas las comparaciones). Así se generaron modelos combinados mediante *backward stepwise selection* utilizando el área bajo la curva como criterio, tanto para OS como para PFS (los detalles de las funciones de supervivencia generadas se pueden encontrar en los métodos suplementarios del original de referencia(2)). Dado que el tipo de procedimiento utilizado incluye un análisis multivariante (selección por pasos de variables), esto implica que la predicción basada en microARNs es independiente de la provista por el score IPI. Los riesgos relativos asociados a cada uno de los elementos de los modelos combinados se muestran en la figura 7.



**Figura 7. Gráficas de ratios de riesgo.** Se muestra para cada variable continua el log del ratio de riesgo asociado. Este ratio de riesgo se calcula a partir del logaritmo de la diferencia de los rangos intercuartílicos. Por ejemplo, para miR-222, el primer y tercer cuartil son 1.515 y 3.945; la barra muestra el ratio de riesgo. Para PFS:  $\exp(0.315 * [3.945-1.515]) = 2.15$  con el intervalo del 75% y 95%. Para el score IPI, como variable discreta se muestra el log del ratio de riesgo comparando cada uno de los valores con el score 0 como referencia.

A continuación se generaron curvas de Kaplan-Meier para supervivencia global y supervivencia libre de progresión en la serie de test utilizando los modelos combinados. Los casos se estratifican de acuerdo a la distribución en terciles (Figura 8). Se identifica un grupo de pacientes de alto riesgo con supervivencias globales y libres de progresión inferiores al 50% tras 2 años de

seguimiento.

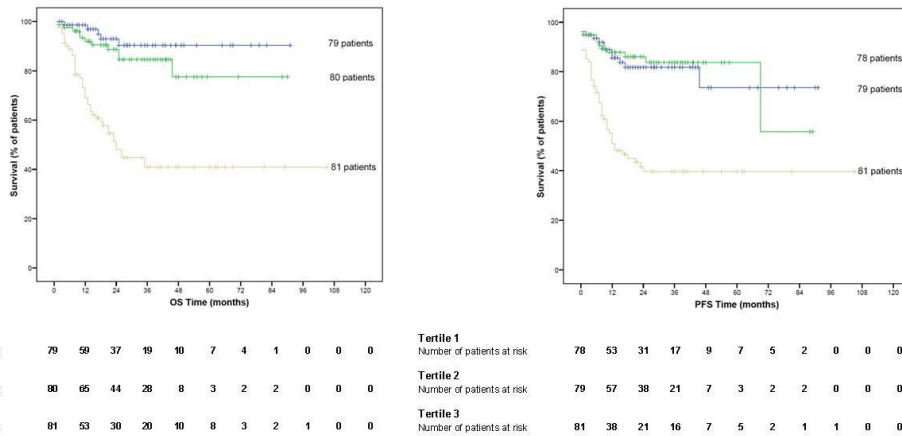


Figura 8: Representación gráfica mediante Kaplan-Meier del modelo que combina microARNs e IPI. Para cada paciente se calculan los scores de supervivencia a partir de la función de supervivencia que combina microARNs e IPI obtenida en la serie de generación del modelo. Tras estratificar en terciles se generan las curvas de supervivencia (test log-rank  $p < 0.001$  para OS y PFS).

**Linfomas B agresivos con diferenciación plasmocelular: caracterización inmunohistoquímica del linfoma plasmablástico y el linfoma B difuso de célula grande con un fenotipo plasmablástico parcial. ( de “Aggressive large B-cell lymphoma with plasma cell differentiation: immunohistochemical characterization of plasmablastic lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma with partial plasmablastic phenotype”(3)).**

El linfoma plasmablástico ha sido reconocido en la última clasificación de las neoplasias linfoides de la OMS como una entidad clinicopatológica dentro del grupo de los linfomas B no Hodgkin. Se considera que es una neoplasia derivada de células B con diferenciación terminal que muestran un inmunofenotipo equivalente al de las células plasmáticas. El diagnóstico diferencial con el Linfoma B Difuso de célula grande convencional de tipo ABC y el mieloma de células plasmáticas de morfología plasmablástica es difícil de establecer desde el punto de vista morfológico e inmunofenotípico debido a la ausencia de un fenotipo característico de esta entidad. En este trabajo se presenta un análisis de la variabilidad fenotípica en una serie de 35 casos de linfoma plasmablástico utilizando nuevos marcadores inmunohistoquímicos de diferenciación plasmocelular como PRDM1/Blimp1 y XBP1s(63, 67). Asimismo se realiza una correlación entre el fenotipo plasmablástico y el curso clínico, comparando con una serie control de LBDCG convencional.

### **El linfoma plasmablástico muestra inmunofenotipos característicos.**

Se ha encontrado que los casos de linfoma plasmablástico (LPB) muestra dos inmunofenotipos principales (figura 9 y tabla 5). El más común (en 20 casos, 57%) consiste en un fenotipo plasmablástico completo con pérdida de

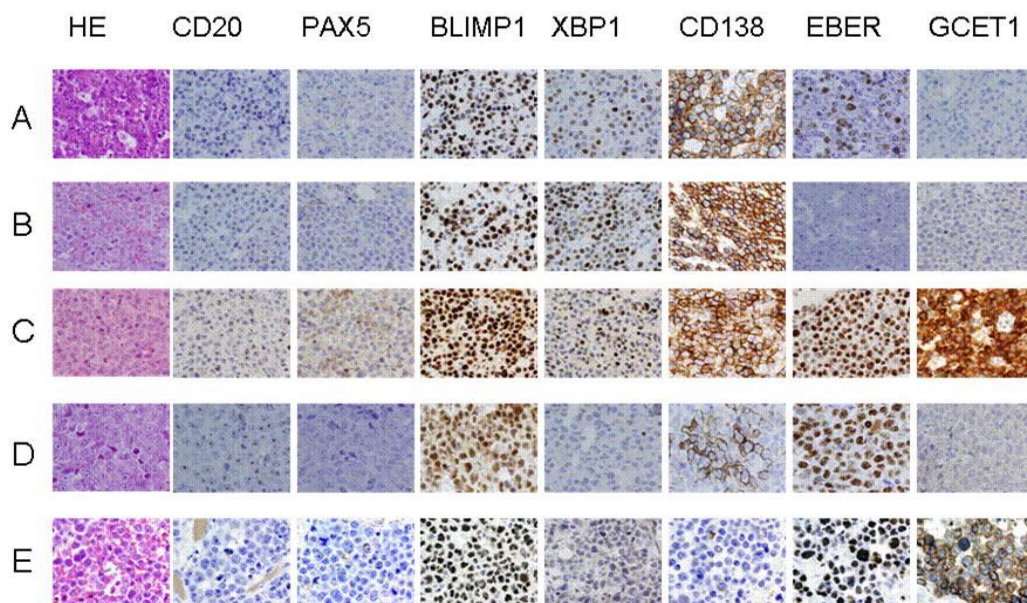
marcadores de diferenciación B (CD20 y PAX5 negativos o débilmente positivos) y expresión de dos marcadores de diferenciación plasmocelular (PRDM1/Blimp1 y XBP1s). La mayoría de estos casos muestran expresión de superficie de CD138 (13 casos). Dos casos diagnosticados previamente con LBDCG NOS en la serie control mostraron el mismo fenotipo por lo que se reclasificaron como LPB. El segundo fenotipo encontrado es el fenotipo plasmablástico variante que se define por la pérdida de marcadores B y presencia de menos de dos marcadores de diferenciación plasmocelular. Este fenotipo se encuentra en 15 casos (43%). Este grupo se divide en:

- 11 casos (31%) con ausencia o expresión débil de CD20 y PAX5 y expresión de PRDM1/Blimp1 con negatividad para XBP1s. De éstos en 5 casos se observa expresión de CD138.
- 4 casos con inmunofenotipos atípicos: un caso positivo con XBP1s y negativo para el resto de marcadores, 3 casos negativos para los 4 marcadores utilizados.

Al comparar los casos positivos para EBV mediante hibridación in situ para EBER con los casos negativos se observaron diferencias significativas en la expresión de marcadores B. Así, el 57% de los casos EBV negativos fueron débilmente positivos para CD20 y el 42% débilmente positivos para PAX5, mientras que sólo el 13 y 16% de los casos EBV positivos fueron débilmente positivos para CD20 y PAX5 respectivamente, siendo el resto consistentemente negativos. La expresión de Ki67 fue uniformemente elevada en todos los casos (media de 87%). La inmunotinción para p53

demonstró positividad débil en la mayoría de los casos con un 17% de los mismos con intensidad fuerte sugestiva de mutación de p53.

Como hallazgo relevante se observó positividad para CD10, GCET1 y KLHL6, marcadores de célula B del centro germinal(1) en una fracción de las muestras. 9 casos (26%) fueron positivos para GCET1, 5 casos (14%) fueron positivos para KLHL6 y 7 casos (20%) fueron positivos para CD10 (figura 9). Adicionalmente se encontró expresión de BCL6 en 2 casos. IRF4/MUM1 fue positivo en todos excepto en dos casos.



**Figura 9. Perfiles de expresión inmunohistoquímica en linfoma plasmablastico.** (A) Fenotipo plasmablastico completo (positividad para PRDM1/Blimp1, XBP1s y negatividad o positividad débil para CD20 y PAX5), con expresión de CD138 y EBV-EBER mediante hibridación in situ cromogénica. (B) Fenotipo plasmablastico completo en ausencia de expresión de EBV-EBER. (C) Fenotipo plasmablastico completo con expresión de GCET1. (D) Fenotipo plasmablastico variante con expresión de EBV-EBER. (E) Fenotipo plasmablastico variante con expresión de GCET1.

N	EBV-EBER (ISH)	CD20	PAX5	BLIMP1	XBP1	GCET1	KLHL6	BCL6	CD10	MUM1	CD38	CD138
1	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+
2	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+
3	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+
4	+	+/-	+/-	+	+	-	-	-	-	+	+	-
5	+	-	-	+	+	+	+/-	-	+	+	+	-
6	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-
7	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-
8	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-
9	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+
10	+	+/-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+
11	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+
12	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+
13	-	+/-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+
14	-	+/-	+/-	+	+	-	+	-	-	+	+/-	-
15	+	-	+/-	+	+/-	+	+/-	-	-	+	+	-
16	+	-	-	+	+/-	+/-	-	-	-	+	+	+
17	+	-	-	+	+/-	-	-	-	+	+	+	+
18	+	-	-	+	+/-	+	+/-	-	-	+	+	+
19	+	-	+/-	+	+/-	-	-	-	-	+	+	+
20	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+/-
21	+	+/-	+/-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
22	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-
23	+	-	-	+	-	+/-	-	-	-	+	+/-	+/-
24	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-
25	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+
26	+	+/-	+/-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
27	-	+/-	+/-	+	-	-	+	+/-	-	+	+	-
28	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+
29	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+
30	+	-	-	+/-	-	-	-	-	+	+	+	+
31	+	-	-	+/-	-	-	-	-	-	+	+/-	-
32	+	-	-	-	+/-	-	-	-	-	+	+	+/-
33	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-
34	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
35	-	+/-	+/-	-	-	-	-	-	-	+	+	-

**Tabla 5. Perfil fenotípico del linfoma plasmablastico.** Se encuentran dos perfiles de expresión bien definidos, un fenotipo plasmablastico completo (positividad para PRDM1/Blimp1 y XBP1s y negatividad o positividad débil para CD20 y PAX5) en 20 casos (57%) y un fenotipo plasmablastico variante (positividad para PRDM1/Blimp1 y negatividad para XBP1s con negatividad o positividad débil para CD20 y PAX5) en 11 casos (31%). 4 casos no se pudieron clasificar con esta combinación de marcadores y se consideraron fenotipo variantes. Se muestran scores semicuantitativos con (+) si se observa positividad para el marcador en más del 30% de la celularidad neoplásica, (+/-) si se observa positividad en más del 10% pero menos del 30% y (-) si hay menos del 10% de células teñidas.



**El fenotipo plasmablástico es muy inusual en los casos de LBDCG convencional (NOS).**

Los fenotipos plasmablásticos aquí descritos, completo y variante son muy inusuales en casos de LBDCG convencional, incluyendo el subtipo no-GCB según el algoritmo de Hans(57). Específicamente, mientras que la positividad para PRDM1/Blimp1 se encontró en un 25% de los casos de LBDCG de la serie control, la positividad para XBP1s se da en menos del 5% de los casos. Sólo 5 de los 111 casos de LBDCG de la serie control fueron positivos para PRDM1/Blimp1 y XBP1s. Tras revisar estos 5 casos, en dos de ellos se observó positividad débil para CD20 y PAX5. Estos dos casos se reclasificaron como linfoma plasmablástico. El resto de casos de LBDCG fueron claramente positivos para CD20 y PAX5.

**Correlación clínica: el linfoma plasmablástico y el linfoma B difuso de células grandes difieren en su respuesta a la terapia y supervivencia.**

Las características clínicas de la serie de linfomas plasmablásticos se resumen en la tabla 6. La mayoría de los pacientes son varones (21 varones, 9 mujeres, 5 sin dato) y la edad mediana fue 48 años (rango 31-84 años). En 27 casos se estudió la infección por VIH de modo que 20 casos fueron positivos y 7 negativos. El diagnóstico diferencial con el mieloma múltiple se estableció en base a criterios clínicos (ausencia de lesiones líticas óseas, paraproteína sérica y ausencia de cadenas ligeras en suero u orina). En 5 casos se encontró infiltración ósea, cuatro de los cuales (casos 3, 4, 16 y 18) mostraron afectación de macizo facial (hueso maxilar o esfenoides) que encaja bien en la descripción inicial de la entidad como

linfoma plasmablastico de cavidad oral(60). El caso número 28 mostró múltiples lesiones líticas en pared torácica así como afectación de cavidad pleural y ganglios linfáticos. No se observó paraproteína en suero ni orina tras revisar la historia clínica. Se pudo recuperar información relacionada con el tratamiento en 27 casos. De estos 21 recibieron regímenes de tipo CHOP o CHOP-like. Siete de estos 21 casos recibieron quimioinmunoterapia con rituximab. Seis pacientes no recibieron tratamiento quimioterápico por mal estado general o muerte precoz. De los 21 pacientes que recibieron tratamiento quimioterápico 12 (57%) alcanzaron remisión completa después de la primera línea de terapia, 3 (14%) tuvieron una respuesta parcial y 6 (29%) no respondieron o progresaron. En 28 casos se dispuso de datos de seguimiento. La mediana de seguimiento para estos casos fue de 10 meses. La mediana de seguimiento para pacientes vivos en el último control de seguimiento fue de 23 meses (rango 5-61 semanas). La supervivencia global estimada a los 2 años fue de  $42 \pm 10\%$  y la supervivencia libre de progresión de  $42 \pm 12\%$  (figura 10). No se encontraron diferencias significativas en la supervivencia global ni supervivencia libre de progresión entre pacientes que recibieron regímenes basados en antraciclinas con o sin rituximab en esta serie. Los dos casos reclasificados como linfoma plasmablastico mostraron una conducta clínica agresiva con fallo a R-CHOP a los 6 y 7 meses respectivamente.

N.	Sex	Age	Stage	Location at diagnosis	Extranodal disease	IPI	HIV	Treatment (number of cycles)	Response	Relapse	Current status
1	ND	ND	ND	GI tract	GI tract	ND	ND	ND	ND		ND
2	M	49	IV	Oral cavity	Oral cavity	1	Yes	CHOP (2)	PR		Lost
3	F	45	IV	Maxillary sinuses	Maxillary sinuses	1	Yes	CHOP (8)	CR		DWD
4	M	36	IV-B	Sphenoid bone	Sphenoid bone	2	Yes	CHOP + MTX A HIGH DOSES (1)	NR		DWD
5	M	59	IV-B	Oral cavity		ND	Yes	HAART	PR		DWD
6	M	42	IVA	LN		2	Yes	R-CHOP (6)	CR	Yes	AWD
7	M	40	II-A	LN		1	Yes	EPOCH (6)+ MTX + ARA-C	CR		AWOD
8	M	47	IV	Oral cavity	Oral cavity	3	Yes	R-CHOP (4)	CR		DWD
9	F	44	IV-B	LN	Bone marrow, lung, skin, spleen, liver, oral cavity	4	Yes	EPOCH (3)+ ESHAP (1)	NR		DWD
10	M	51	IV	GI tract	GI tract, lung, liver	4	ND	Surgical	ND		DWD
11	M	52	I-A	Nose	Nose	0	Yes	RT	PR		AWD
12	F	31	ND	Perirectal tissues	Perirectal tissues	ND	Yes	R-CHOP (6)	CR		DWOD
13	F	63	IIB	GI tract and skin	GI tract and skin	2	No	CODOX M-IVAX R (2) + R-CHOP (1)	CR	Yes	DWD
14	F	81	II	Oral cavity	Cavum	2	No	R-CHOP (4) + RT	CR		AWOD
15	F	38	I	Ear	Ear	0	Yes	HYPER-CVAD (2) +RT	PR		AWD
16	M	56	IIA	Maxillary sinuses	Maxillary sinuses	0	No	R-CHOP (6)	CR		AWOD
17	F	35	IV-A	Oral cavity	Oral cavity	ND	Yes	EPOCH (3)	NR	Yes	AWD
18	M	38	II	Oral cavity	Soft tissues, maxillary bone	1	Yes	EPOCH (4) + CHOP (1)	NR		DWD
19	ND	ND	ND	GI tract		ND	ND	ND	ND		ND
20	M	59	III-B	GI tract	GI tract	3	Yes	CHOP (8)	NR	Yes	DWD
21	M	82	ND	Oral cavity	Oral cavity	ND	No	ND	ND		Lost
22	M	50	ND	GI tract		ND	Yes	GENTAMICIN	ND		DWD
23	M	39	IV-B	GI tract	GI tract, lung, spleen, liver	3	Yes	EPOCH (6)	CR		AWOD
24	M	46	IV	Testicle	Testicle, lung, spleen	2	Yes	EPOCH (6), Surgical	CR	Yes	AWOD
25	M	84	IV-B	LN	GI tract, prostate, bladder	5	ND	Palliative			DWD
26	ND	ND	ND	ND		ND	ND	ND	ND		ND
27	F	84	ND	Skin		ND	ND	ND	ND		DWD
28	M	53	II	Pleura	Pleura, soft tissues, bone	2	No	CHOP-LIKE (5)	CR	No	AWOD
29	ND	ND	ND	LN		ND	ND	ND	ND		ND
30	ND	ND	ND	Uterine cervix	Uterine cervix	ND	ND	ND	ND		ND
31	M	73	II	LN		3	No	CHOP-LIKE (8) + RT	PR	No	AWOD
32	M	36	II	LN		ND	Yes	DBT	NR		DWD
33	M	45	IV	Oral cavity	Oral cavity	2	Yes	CHOP (8)	NE		Alive
34	M	47	IV	Pleura and bone marrow	Pleura and bone marrow	ND	Yes	Palliative	ND		DWD
35	F	76	IV-B	LN	Lung	4	No	R-CHOP (6)	CR		DWOD
36*	M	60	IVA	LN	Urinary Bladder	4	No	R-CHOP (6)	CR	Yes	DWD
37*	M	52	IVA	Lung		2	No	R-CHOP (6)	NR		AWD

**Tabla 6. Características clínicas de los casos de linfoma plasmablastico. (de material suplementario S3 en (3)).** *M: male, F. female; GI: gastrointestinal, LN: lymph node, RT: radiotherapy, HAART: highly active antiretroviral therapy, CR: complete response, PR: partial response, NR: no response, NE: not evaluated; AWD: alive with disease; AWOD: alive without disease; DWD: dead with disease; DWOD: dead without disease; ND: no data available. Cases 36\* and 37\* were previously classified as DLBCL (véase el texto).*

Del grupo control de 111 casos de LBDCG 58 casos (52,3%) era varones y 53 (47,7%) mujeres. La edad mediana fue de 62 años (rango de 23 a 88 años). La mayoría de estos pacientes recibieron CHOP (97 pacientes, 87%), nueve se trataron con terapias CHOP-like (8%) y 5 con MegaCHOP (4,5%). Todos los pacientes recibieron rituximab en combinación con regímenes basados en antraciclinas. 88 pacientes (79%) alcanzaron remisión completa, 10 pacientes (9%) remisión parcial y en 11 pacientes (10%) no se encontró respuesta o hubo progresión. Las tasas de respuesta (remisión completa o remisión parcial) fueron significativamente distintos al comparar los casos de linfoma plasmablástico con los de LBDCG ( $\chi^2$   $p < 0.05$ ).

Se dispuso de datos de seguimiento completos en todos los pacientes de este grupo. La mediana de seguimiento fue de 17 meses (rango 1-48 meses). La mediana de seguimiento para los pacientes vivos en el último control de seguimiento fue de 23 meses (rango de 2 a 48 meses). La supervivencia global estimada a 2 años fue de  $69 \pm 5\%$  y la supervivencia libre de progresión de  $65,7 \pm 5\%$ . Al comparar supervivencia global y libre de progresión mediante los test de log-rank y Breslow, las diferencias entre LBDCG convencional y linfoma plasmablástico son significativas ( $p < 0.001$ ). Incluso cuando se comparan los casos de linfoma plasmablástico con los casos de LBDCG no-GCB, la forma más agresiva de LBDCG, se siguen observando diferencias significativas en OS y PFS: la supervivencia global estimada a los dos años para LBDCG no-GCB fue de  $65 \pm 7\%$  comparada con  $42 \pm 10\%$  para los casos de LPB ( $p < 0.05$ ); la supervivencia libre de progresión a 2 años para los LBDCG no-

GCB fue de  $63 \pm 7\%$  comparada con  $39 \pm 10\%$  para los casos de LPB (figura 10).

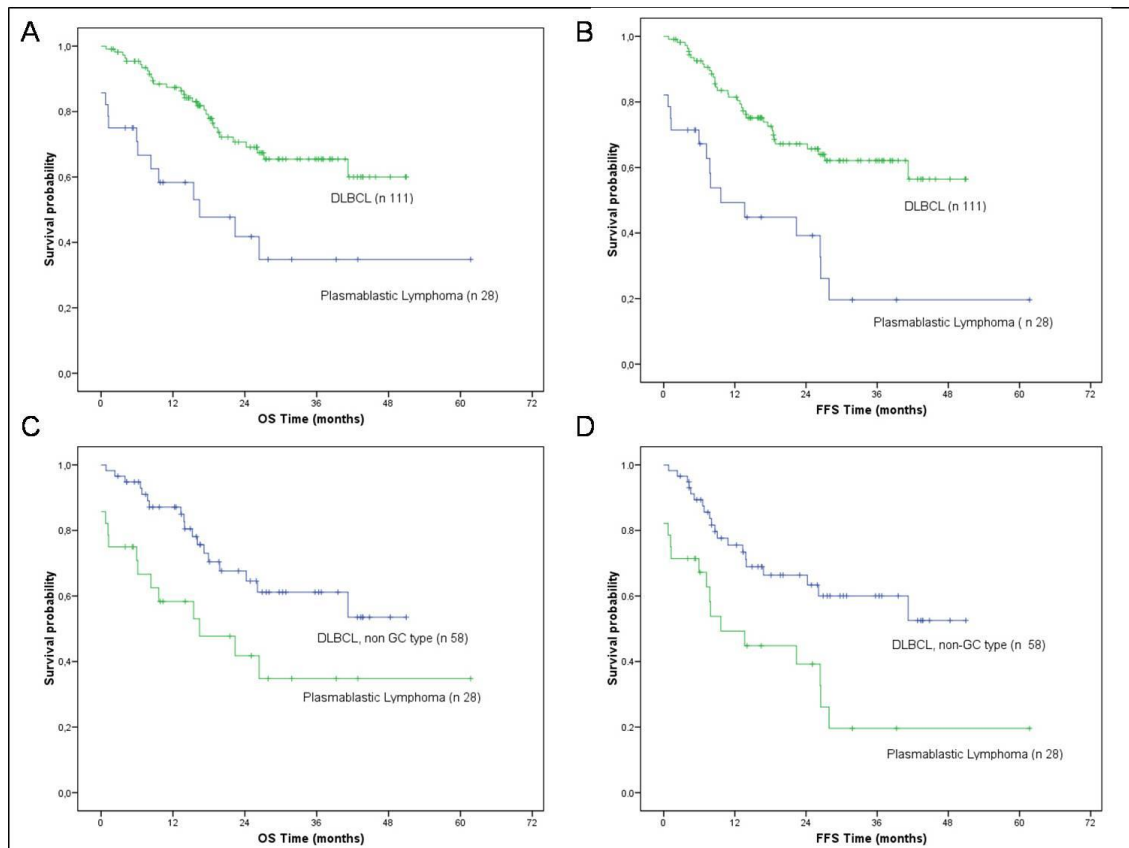


Figura 10. El linfoma plasmablástico y el linfoma B difuso de células grandes muestran claras diferencias en respuesta a terapia y supervivencia. (A y B). Se observan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.001$  mediante log-rank y Breslow) en las curvas de supervivencia global (OS) y supervivencia libre de progresión (PFS). (C y D) Al comparar el LBDCG no-GCB con el linfoma plasmablástico las diferencias en supervivencia global y supervivencia libre de progresión son también significativas ( $p < 0.05$ ).

### **Linfomas B difusos de célula grande con expresión de PRDM1/Blimp1.**

Cuando los casos de LBDCG se estratificaron de acuerdo con la expresión de PRDM1/Blimp1 se encuentra un subgrupo de casos con pronóstico intermedio entre el linfoma plasmablástico y el LBDCG PRDM1/Blimp1 negativo. Estos

casos de LBDCG positivos para PRDM1/Blimp1 tienen una supervivencia global estimada a los dos años de  $42 \pm 10 \%$  y una supervivencia libre de progresión de  $39 \pm 10\%$  (figura 11). La mayoría de estos casos de LBDCG PRDM1/Blimp1 positivos fueron considerados de tipo no-GCB según el algoritmo de Hans (20/58 casos no-GCB fueron PRDM1/Blimp1 positivos; 8/53 casos de tipo GCB fueron PRDM1/Blimp1 positivos,  $\chi^2 p < 0.05$ ). Estos datos demuestran que la adquisición de un fenotipo plasmablástico parcial en casos de LBDCG se asocia con conducta clínica agresiva.

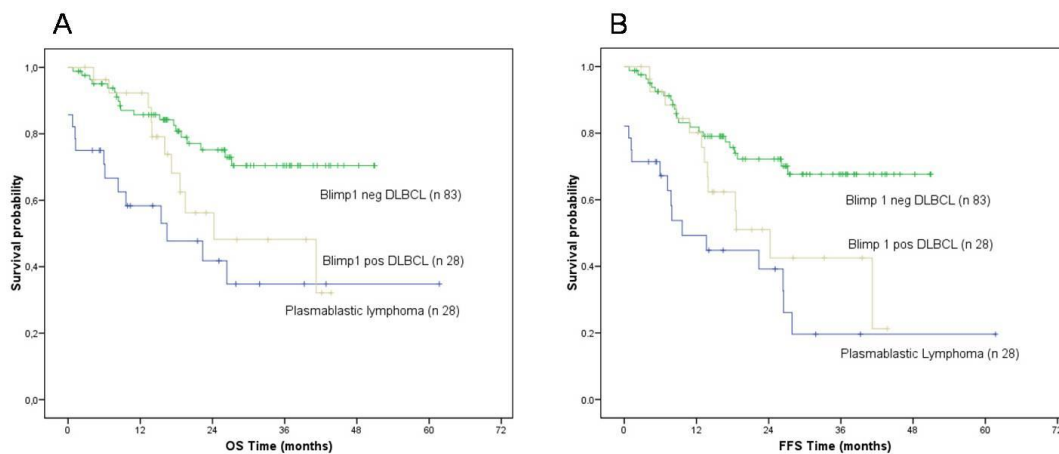


Figura 11. Supervivencia global (A) y supervivencia libre de progresión (B) en los casos de LBDCG en función de la expresión de PRDM1//Blimp1. La expresión inmunohistoquímica de PRDM1/Blimp1 identifica un subgrupo de casos de LBDCG con pronóstico intermedio entre linfoma plasmablástico y LBDCG PRDM1/Blimp1 negativo. La supervivencia global estimada para este subgrupo de pacientes es de  $48 \pm 12 \%$  y la supervivencia libre de progresión estimada de  $44 \pm 12\%$ .

**El linfoma B difuso de células grandes EBV positivo asociado a la edad avanzada es una neoplasia agresiva de fenotipo post-centrogerminal caracterizada por una activación intensa de NF-kB (de “EBV-positive diffuse large B-cell lymphoma of the elderly is an aggressive post-germinal center B-cell neoplasm characterized by prominent nuclear factor-kB activation”(4) ).**

El linfoma B difuso de células grandes EBV positivo y asociado a edad avanzada es un subtipo de linfoma recientemente reconocido como entidad provisional dentro del grupo de LBDCG en la más reciente versión de la clasificación de la OMS.. La evidencia disponible sobre su incidencia en nuestro medio y características clínicas, patológicas y fenotípicas es limitada(38, 39). Las series clínicas publicadas sugieren que los pacientes con este tipo de linfoma muestra un mayor riesgo de fallo a la terapia(90, 91) siendo la edad mayor de 70 años y la presencia de síntomas B los factores clínicos asociados con supervivencia global(37). En relación con los factores biológicos que pueden influir en la respuesta al tratamiento y la supervivencia se conoce que la positividad para EBV en las células neoplásicas es un factor de riesgo(37, 91). Sin embargo no se han estudiado en detalle otros factores biológicos relacionados con pronóstico en LBDCG como el fenotipo GCB/ABC en este tipo de neoplasia. Tampoco se ha aclarado de qué modo la presencia de EBV puede estar relacionada con la inducción de un fenotipo activado en estas neoplasias. En este trabajo se analizó una serie retrospectiva de 47 casos de LBDCG EBV positivo en pacientes añosos. Se han caracterizado sus características clinicopatológicas y detallado su perfil inmunohistoquímico,

citogenético (mediante análisis de FISH) y de clonalidad linfoide, analizando la correlación con variables clínicas. Nuestros resultados demuestran que los linfomas B difusos de célula grande asociados con EBV en pacientes añosos son una neoplasia linfoide B clonal agresiva con un fenotipo activado (ABC) que está asociado con la activación de las vías clásicas y alternativas de NFκB.

### **Descripción patológica del linfoma B difuso de célula grande EBV positivo asociado a edad avanzada.**

El diagnóstico se realizó en ganglios linfáticos en 31 casos (66%) mientras que en 16 casos (34%) el diagnóstico se hizo en áreas extraganglionares (véanse los detalles en la tabla 7). El estudio morfológico mediante hematoxilina y eosina demostró que la mayoría de los casos (46) estaban caracterizados por un borramiento parcial o total de la arquitectura ganglionar por una proliferación neoplásica polimorfa, rica en células grandes. Sólo un caso (número 31) estaba compuesta de forma exclusiva por una proliferación monomorfa, de morfología inmunoblástica. En dos casos (casos 29 y 46, figura 12) se identificó un patrón mixto con áreas polimorfas y otras monomorfas. Los casos polimorfos se suclasificaron en tres subgrupos, en base a la proporción relativa de células grandes y la presencia de células semejantes a las células de Reed-Sternberg y Hodgkin. Así, 29 casos fueron considerados neoplasias de células B grandes (forma canónica, con una alta densidad de células grandes y aisladas células de morfología sternbergoide o Hodgkin-like), 8 casos se consideraron linfomas B de células grandes con características Hodgkin-like (con menor densidad de celularidad neoplásica y células de morfología reminiscente de las células de Reed-Sternberg y Hodgkin) y 9 casos se consideraron linfomas B difusos de



células grandes con características semejantes al desorden linfoproliferativo polimorfo (escasa densidad de células neoplásicas sin características de tipo Hodgkin). De forma característica un caso (número 11) mostró características intermedias entre los tumores de tipo linfoma B de células grandes y los de rasgos Hodgkin-like, consistentes con el diagnóstico de linfoma B con rasgos intermedios entre linfoma de Hodgkin y Linfoma B difuso de células grandes. El patrón de infiltración tisular fue nodular o vagamente nodular en 29 casos (62%) y difuso en el resto (18 casos, 28%). Un caso (número 14) demostró un patrón de tipo predominio linfocítico nodular (Hodgkin PL-like) junto con un área de crecimiento difuso. Este caso también mostró un fenotipo solapado con el linfoma de Hodgkin de tipo predominio linfocítico nodular excepto por la presencia de células EBV positivas y la pérdida de expresión de BCL6. Se encontró necrosis geográfica significativa en 14 casos (29%).

Los tumores mostraron una variedad celular y polimorfismo llamativos, variables en función del subtipo morfológico. Los casos de tipo Hodgkin-like se caracterizan por la presencia de células de tipo Reed-Sternberg y Hodgkin-like distribuidas de forma salpicada en una población neoplásica relativamente paucicelular. Los casos de tipo células grandes y semejantes a desorden linfoproliferativo polimorfo mostraron un grado evidente de diferenciación inmunoblástica y plasmocitoide, inhabitual en los casos de tipo Hodgkin-like ( $\chi^2$ :  $p < 0.05$ ). Se realizaron tinciones de cadenas ligeras ( $\kappa$  y  $\lambda$ ) en 29 casos. De éstos, 22 casos mostraron restricción de cadenas ligeras (13 fueron  $\kappa$  y 9  $\lambda$ ). Cinco casos tuvieron una tinción de fondo intensa y en dos casos no era evidente el predominio de una única cadenas ligera. Una característica peculiar

observada en 11 casos (23%) fue la presencia de estructuras semejantes a centros germinales abortivos compuestas de células grandes, células dendríticas foliculares y linfocitos pequeños (véase caso número 29-1 en la figura 12). En el compartimento no neoplásico o microambiente se encontraron linfocitos pequeños y células plasmáticas en proporciones variables. En 12 casos se observaron histiocitos pero sólo en un caso (número 36) se observaron granulomas epitelioides pobremente definidos. En ningún caso se encontró un infiltrado polimorfonuclear neutrofílico. Sólo en dos casos (números 39 y 44) se encontraron aislados eosinófilos en el fondo celular. Se pudo evaluar la médula ósea en dos casos (números 23 y 26). El patrón de infiltración en estos casos fue de tipo intersticial multifocal por agregados de células de aspecto Hodgkin-like.

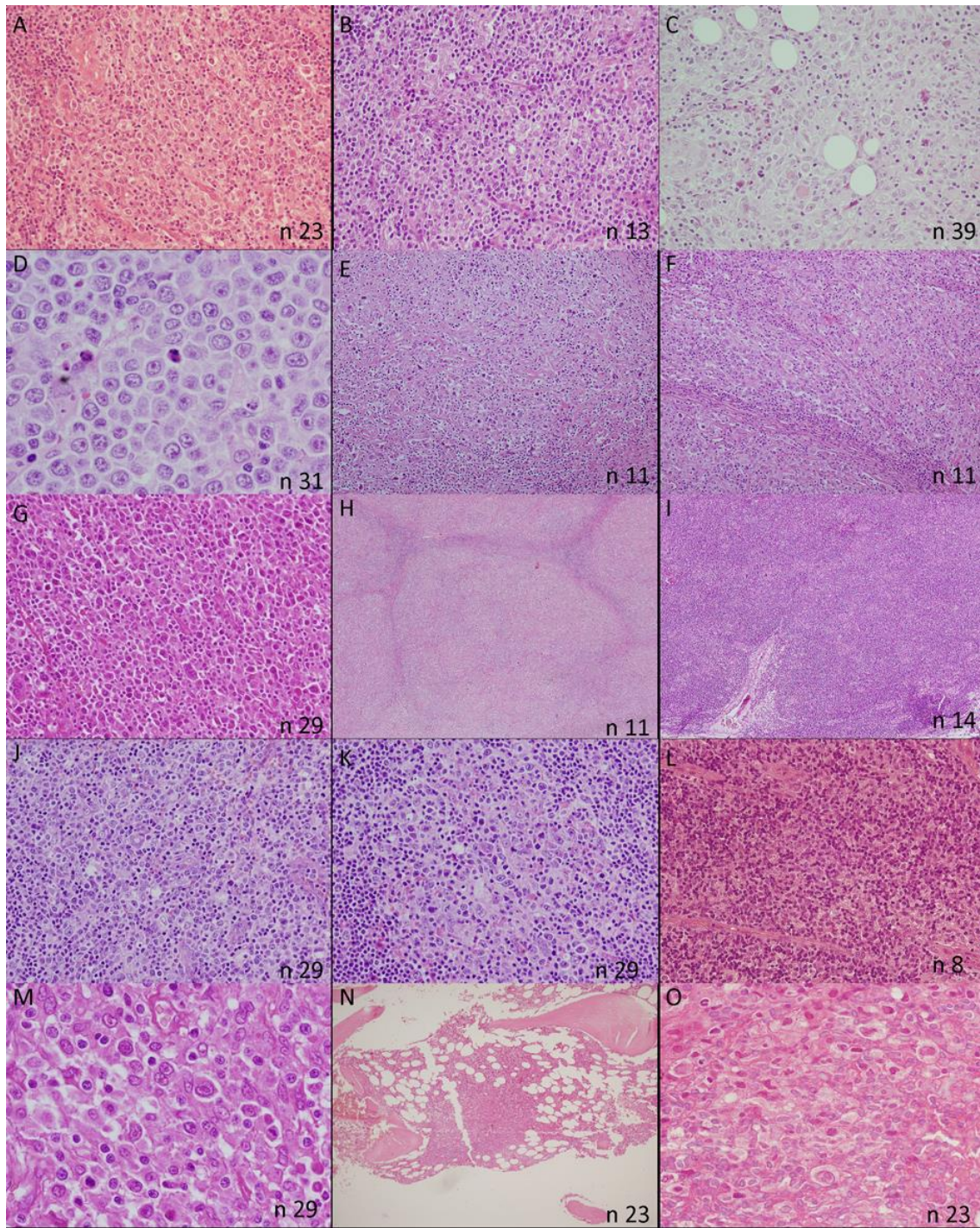


Figura 12. Características histopatológicas de los casos de linfoma B difuso de célula grande asociado a EBV y edad avanzada. Se muestra la morfología de un caso tipo linfoma B de células grandes (A), tipo desorden linfoproliferativo polimorfo (B) y tipo Hodgkin-like (C). El patrón puro monomorfo e inmunoblástico se encontró en un único caso (D) mientras que la presencia de áreas de transición entre patrones monomorfo y polimorfo no son

infrecuentes (G). Un caso mostró rasgos intermedios entre el patrón de tipo células grandes (F) y el patrón Hodgkin-like (E). (H e I) El patrón nodular de crecimiento es común, observándose en el 62% de los casos con un caso mostrando un patrón de tipo Hodgkin predominio linfocítico nodular (I). (J) Los casos de tipo células grandes y semejantes al desorden linfoproliferativo polimorfo mostraron una evidente diferenciación inmunoblástica y plasmocitoide. (K) La presencia de estructuras semejantes a centros germinales compuestos de blastos, células dendríticas foliculares y linfocitos pequeños es una peculiaridad presente en el 23% de los casos. (L) El componente celular no neoplásico contiene linfocitos pequeños y células plasmáticas en proporción variable. (M) El examen citológico a mayor detalle de los tumores de tipo B de célula grande muestra una población con alta densidad de células grandes de morfología inmunoblástica y un espectro de diferenciación plasmocitoide. (N,O) La médula ósea muestra una infiltración multifocal e intersticial por una celularidad de características Hodgkin-like.

**El linfoma B difuso de células grandes asociado a EBV y edad avanzada muestra un fenotipo post-centrogerminal relacionado con intensa activación de NFkB.**

El análisis inmunohistoquímico de los casos (véase tabla 7) demostró que todos los casos fueron CD20 positivos y expresaron con frecuencia CD30 (41/46 casos, 89%) y muy raramente CD15 (4/43, 9%). El estudio de hibridación in situ para EBER demostró positividad en todos los casos mientras que siete casos fueron negativos con inmunohistoquímica para EBV-LMP1. La mediana del porcentaje de células positivas con EBER fue del 80% (rango 10-100%). En 45 de 47 casos (96%) se encontró sobreexpresión de la proteína antiapoptótica BCL2. En el 84% de los casos el índice proliferativo medido con Ki67 era superior al 50% de la celularidad neoplásica.

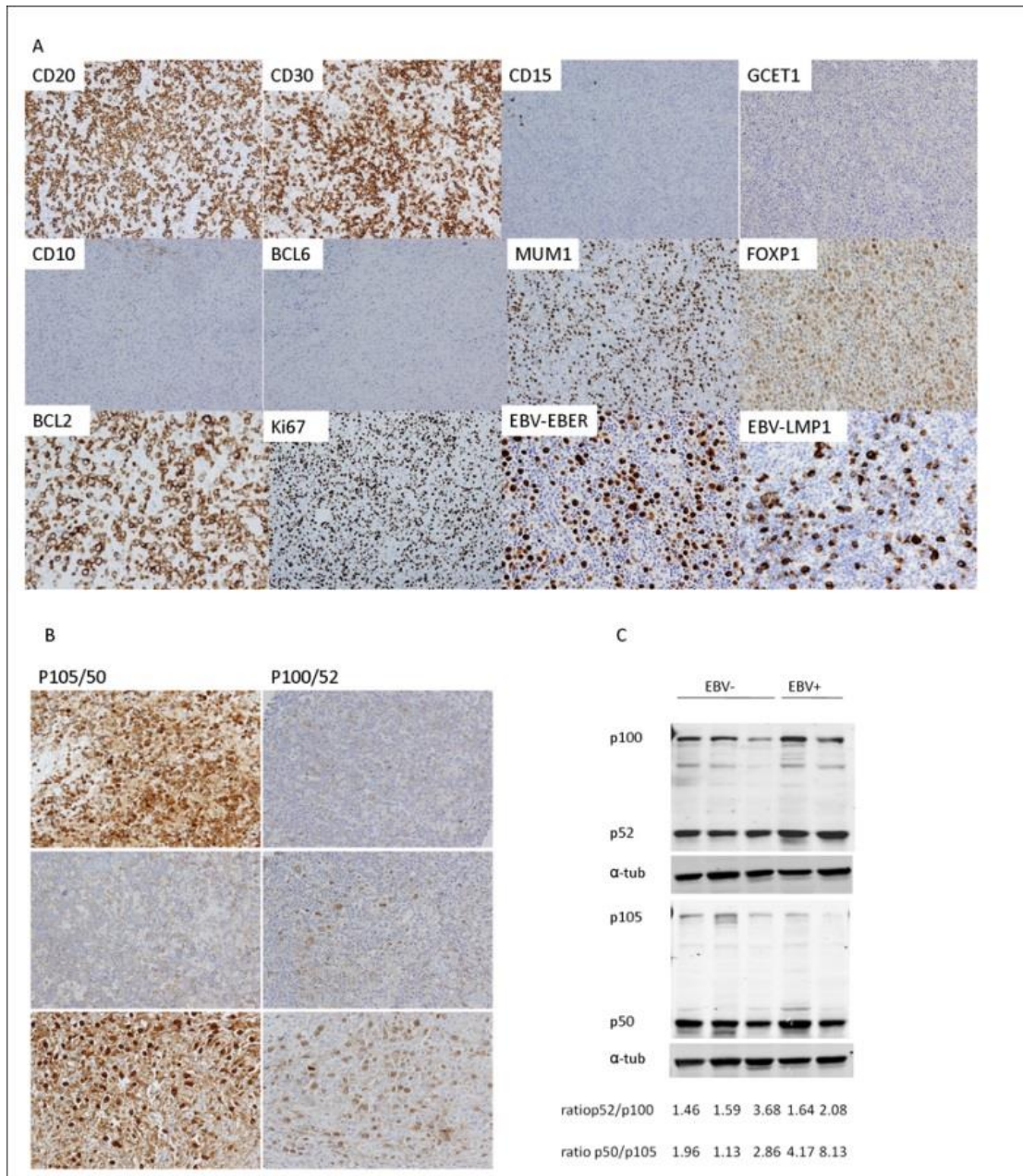
Al agrupar los casos de acuerdo con la clasificación en fenotipos GCB/ABC utilizando los algoritmos de Hans y cols.(57) y Choi y cols.(58) se observó que la mayoría de los casos pertenecen a la categoría de fenotipo no-GCB/ABC (95% de tipo no-GCB según el algoritmo de Hans y 78% de fenotipo ABC según el algoritmo de Choi). Esta desviación a un fenotipo no centrogerminal se confirmó al comparar los porcentajes con la distribución de estos fenotipos en una serie control de 240 casos de LBDCG negativos para EBV. Con ambos sistemas de clasificación la proporción de casos de fenotipo no-GCB/ABC excede a la esperada al comparar con la serie de casos de LBDCG NOS, EBV negativos (test de  $\chi^2$   $p < 0.05$ ) (tabla 4 en original de referencia(4)).

Ya que la inducción de un fenotipo ABC se ha vinculado a la activación de la vía del factor nuclear kB (NFkB) en LBDCG(92, 93) se midió la expresión de dos subunidades de esta vía, p105/p50 y p100/p52 mediante inmunohistoquímica e inmunoblot. Mediante inmunohistoquímica se encontró expresión nuclear de p105/p50 en el 79% de los casos y de p100/p52 en el 74% de los casos. En el 63% de los casos evaluados (27/43) se observó coexpresión de ambas proteínas de localización nuclear, lo cual es una evidencia indirecta de la activación tanto de la vía clásica como alternativa de NFkB (figura 13 y tabla 4 en original de referencia(4)). Adicionalmente se observó una mayor proporción de casos expresando p105/p50, p100/p52 o ambas proteínas en los casos de LBDCG EBV positivos en comparación con los casos EBV negativos de control (test  $\chi^2$ :  $p < 0.001$  para todas las comparaciones). Esta sobreexpresión de las proteínas relacionadas con NFkB también resultó ser mayor de lo esperado en los casos EBV positivos cuando

se comparan con los casos EBV negativos de fenotipo ABC ( $\chi^2$   $p < 0.001$ ). Adicionalmente cuando los casos fueron clasificados con el algoritmo de Choi no se encontraron diferencias significativas en la sobreexpresión de p105/p50, p100/p52 o ambas entre ambos subtipos, GCB y ABC, indicando que esta sobreexpresión de NFkB también se encuentra en casos de fenotipo GCB y que EBV puede jugar un papel en la sobreactivación de NFkB en LBDCG, independientemente del fenotipo GCB/ABC.

Los experimentos de inmunoblot confirmaron la expresión de las subunidades de NFkB en las muestras de LBDCG. Como se muestra en la figura 13 se encontraron ratios mayores de p50/p105 en las muestras de LBDCG EBV positivos en comparación con las de los casos control, EBV negativos, indicando un mayor procesamiento de p105 a p50 (vía clásica de NFkB). También se encontró un procesamiento activo de la proteína asociada a la vía alternativa, p100 a p52.

En resumen, los casos de LBDCG EBV positivos muestran un fenotipo activado y expresión nuclear y procesamiento activo de las subunidades proteicas relacionadas con las vías clásica y alternativa de NFkB (p105/p50 y p100/p52, respectivamente). Ya que esta activación de la vía es mayor que en los casos de LBDCG EBV negativos es plausible que EBV juegue un papel directo en la superactivación de NFkB. Esta activación de NFkB es común en este grupo de linfomas EBV positivos a los dos subtipos de LBDCG, GCB y ABC.



**Figura 13. El linfoma B difuso de células grandes EBV positivo muestra un perfil fenotípico ABC con marcada activación de NFkB y sobreexpresión de BCL2. (A)**

Perfil inmunohistoquímico típico del LBDCG EBV positivo asociado a edad avanzada con expresión moderada-intensa de CD20 en la mayoría de la población neoplásica. La coexpresión de CD30 es común. Los tumores mostraron ausencia de expresión de marcadores asociados con fenotipo centrogerminal como CD10, BCL6 y GCET1 y expresión de MUM1 y FOXP1. La proteína antiapoptótica BCL2 se sobreexpresó en el 96% de los casos. En el 84% de los casos se encontró un índice proliferativo mayor del 50%, medido con Ki67. La

hibridación in situ para EBV-EBER demostró positividad en todos los casos mientras que 7 casos testados fueron negativos para EBV-LMP1. La mediana del porcentaje de positividad para EBER fue del 80%. Fíjense que tanto EBV-EBER como EBV-LMP1 se expresan en células de tamaño grande e intermedio. Obsérvese también que el porcentaje de células EBV-LMP1 positivas fue menor que el de células EBER positivas en los casos pareados. (B) Las proteínas relacionadas con NFkB p105/p50 y p100/p52 se sobreexpresan con localización nuclear en la mayoría de los casos de linfoma B difuso de células grandes EBV positivo asociado a edad avanzada. La sobreexpresión nuclear se toma como evidencia indirecta de la actividad de las vías clásica (p50) y alternativa (p52) de NFkB. (C) Los experimentos de inmunoblot demuestran el mayor grado de procesamiento activo de estas proteínas en muestras primarias. La activación de la vía da lugar a degradación de p105 y p100 y aumento de la expresión de p50 y p52 respectivamente. El procesamiento activo es evidente en la vía clásica pero también se da en la vía alternativa en comparación con las muestras de LBDCG EBV negativo.



Tabla 7: Resumen de las principales características clínicas, histopatológicas y evaluación inmunohistoquímica con subclasificación de la serie en fenotipos GCB/ABC.

PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS			EVALUACIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA	
EDAD		MEDIA 69 (48-91)	Marcador IHQ	N casos positivos/Total N of casos (%)
<b>GÉNERO</b>	VARON	31 (66%)	CD20	47/47 (100%)
	MUJER	16 (34%)	CD30	41/46 (89%)
<b>LOCALIZACIÓN</b>			CD15	4/43(9%)
			GCET1	4/40 (10%)
	GANGLIONAR	31 (66%)	CD10	2/43 (5%)
	EXTRAGANGLIONAR	16 (34%)	BCL6	17/46 (37%)
	PARTES BLANDAS	3	MUM1	43/46 (93%)
	BAZO	3	FOXP1	16/39 (41%)
	AMIGDALA	3	BCL2	45/47 (96%)
	ESTOMAGO	3		
	SNC	1	KI67>50%	40/45 (84%)
	INTESTINO GRUESO	1		
<b>ESTADIO*</b>			EBV-LMP1	37/44 (84%)
			EBER (ISH)	47/47 (100%)
	I	5 (10.6%)	P50**	35/44 (79%)
	II	8 (17%)	P52**	32/43 (74%)
	III	12 (25.6%)	P50&P52**	27/43 (63%)
	IV	11 (23.3%)		
<b>CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS</b>				
<b>PATRÓN POLIMORFO (46 cases)</b>				
Tipo células B grandes (29 casos, 62%)				
Tipo polimorfo semajante a LPPT (9 casos, 19%)				
Tipo Hodgkin-like (8 casos, 17%)				
<b>PATRÓN MONOMORFO (46 casos)</b>				
<b>CLASIFICACIÓN GCB/ABC</b>	<b>LBDCG EBV+ de la edad avanzada</b>		<b>LBDCG EBV negativo</b>	
	<b>N casos positivos/Total N de casos (%)</b>		<b>N casos positivos/Total N de casos (%)</b>	
GCB***	9/41 (22%)		128/324 (39%)	
ABC***	32/41 (78%)		178/324 (55%)	
GCB****	2/44 (4%)		116/324 (35%)	
NO-GCB****	42/44 (95%)		188/324 (58%)	
* en 11 casos se desconoce el dato.				
** sólo la expresión de localización nuclear se considera positiva.				
*** de acuerdo con el algoritmo de Choi.				
**** de acuerdo con el algoritmo de Hans.				

**El linfoma B difuso de células grandes EBV positivo asociado a edad avanzada es una neoplasia B clonal que muestra con frecuencia poblaciones T clonales asociadas.**

Se realizó estudio de clonalidad usando cebadores y métodos estandarizados (Biomed2(94)) a partir de ADN extraído de tejido fijado en formol e incluido en parafina. El ADN no fue suficiente en cantidad o calidad ( $\leq 200$  pb) en seis casos. Los resultados se resumen en la tabla 5 de la publicación de referencia(4). De forma global, 30 de 47 casos (64%) mostraron reordenamientos monoclonales de IgH y/o IgK/Kde/L. Se encontró reordenamiento monoclonal de IgH en 24 de 47 casos (51%). Usando una combinación de cebadores para V $\kappa$ -J $\kappa$  y V $\kappa$ /intron-Kde encontramos 23/47 reordenamientos monoclonales (57%). Se encontraron reordenamientos monoclonales de IgL en 3/17 (17%) de los casos testados. Un caso mostró reordenamientos de IgL en ausencia de reordenamientos de IgK.

Se encontraron una incidencia relativamente alta de reordenamientos clonales del gen de TCR- $\gamma$ : 10 casos (24%) fueron monoclonales en al menos un tubo de TCR-  $\gamma$ ; 2 casos fueron monoclonales en ambos tubos de TCR-  $\gamma$ . No se encontró ningún caso con reordenamientos clonales de TCR- $\beta$ . Por tanto las poblaciones T clonales son comunes en los casos de Linfoma B Difuso de célula grande EBV positivo.

Estos resultados son concordantes con publicaciones previas mostrando expansiones de células T de naturaleza monoclonal u oligoclonal en desórdenes relacionados con EBV, incluyendo mononucleosis infecciosa y desórdenes linfoproliferativos post-trasplante(95, 96). Es plausible que estas

poblaciones monoclonales reflejen la respuesta fisiológica de células T a la infección por EBV (repertorio restringido de células T)(97, 98). El reconocimiento de este hallazgo, esto es, poblaciones T clonales en los casos de Linfoma B Difuso de Células grandes asociado a EBV es útil para evitar un diagnóstico erróneo de neoplasia linfocítica T asociada.

**El linfoma B difuso de célula grande EBV positivo es una neoplasia agresiva con menor supervivencia global y supervivencia libre de progresión en comparación con el Linfoma B Difuso de célula grande EBV negativo.**

Se puede encontrar un resumen de las características clínicas de la serie en la Tabla 7. Se incluyeron 47 casos con una edad media de 69 años (rango 48-91 años). Se encuentra un predominio de varones (31 varones/16 mujeres con un ratio de 2:1). La mayoría de los pacientes se presentaron con enfermedad ganglionar (31 casos, 66%) mientras que la afectación extraganglionar se encontró en 16 pacientes (34%). La localización extraganglionar más frecuente fueron partes blandas, bazo, amígdala y estómago. Tras los procedimientos de estadiaje habitual la mitad de los pacientes mostraron enfermedad avanzada (estadio III y IV en 49% de los pacientes). Tras aplicar el índice Pronóstico Internacional (IPI) que incluye edad, nivel de LDH, estadio, estado funcional y número de afectaciones extraganglionares(22) los pacientes se clasificaron en bajo riesgo (IPI 0-1, 7 pacientes), riesgo bajo-intermedio (IPI 2, 12 pacientes), IPI intermedio-alto (IPI 3, 8 pacientes) o alto riesgo (IPI 4-5, 8 pacientes).

La mayoría de los pacientes con información clínica se trataron con R-CHOP o R-CHOP-like (20 pacientes). Otros regímenes utilizados en 14 pacientes fueron

ABVD, R-MegaCHOP, BAM-BCNU-MTX-ARAC y radioterapia. Dos pacientes no fueron tratados pues fallecieron antes del tratamiento. Tras la terapia 13 pacientes no experimentaron respuesta o progresaron (27%) y 19 respondieron (17 casos con respuesta completa y dos con respuesta parcial). Tres de los 7 pacientes (42%) tratados con ABVD permanecían vivos en el último seguimiento. De los 20 pacientes tratados con regímenes de tipo R-CHOP o R-CHOP-like en 12 casos (60%) el paciente permaneció vivo en el último seguimiento. Sin embargo no hubo diferencias significativas en las curvas de supervivencia en función de la terapia recibida ni el patrón morfológico.

La mediana de seguimiento para todos los casos con dato disponible (38 pacientes) fue de 9 meses. La mediana de seguimiento para los pacientes vivos en el último seguimiento fue de 13 meses. 18 de 38 pacientes con datos disponibles fallecieron. De éstos 5 pacientes fallecieron por causas no relacionadas con el linfoma (neumonía en 4 casos y sepsis en 1 caso) mientras que 7 pacientes fallecieron por el linfoma. En 6 casos la causa de muerte no fue documentada. La supervivencia global estimada a los 2 años fue de  $40 \pm 10\%$  y la supervivencia libre de progresión estimada a los 2 años de  $36 \pm 9\%$ .

Dado que el fenotipo activado (LBDCG tipo ABC) y la edad son dos factores asociados con menor supervivencia en los casos de LBDCG(22, 42, 58, 99) se compararon las distribuciones de supervivencia de los casos de LBDCG EBV positivos frente a una serie control de casos de LBDCG EBV negativos, estratificados por el fenotipo ABC y por la edad avanzada (mayor de 60 años). Los casos de LBDCG EBV positivo en pacientes de edad avanzada tuvieron un pronóstico peor, tanto en comparación con los casos de LBDCG de fenotipo

ABC como los casos EBV negativos en pacientes mayores de 60 años. Estos casos también tuvieron peor pronóstico que los casos de LBDCG EBV negativo de fenotipo ABC en paciente añoso ( $p$  log Rank  $< 0.001$ ) (véase figura 14). Por supuesto, tanto el fenotipo ABC como la edad avanzada tuvieron valor pronóstico en la serie de control de LBDCG EBV negativo(2).

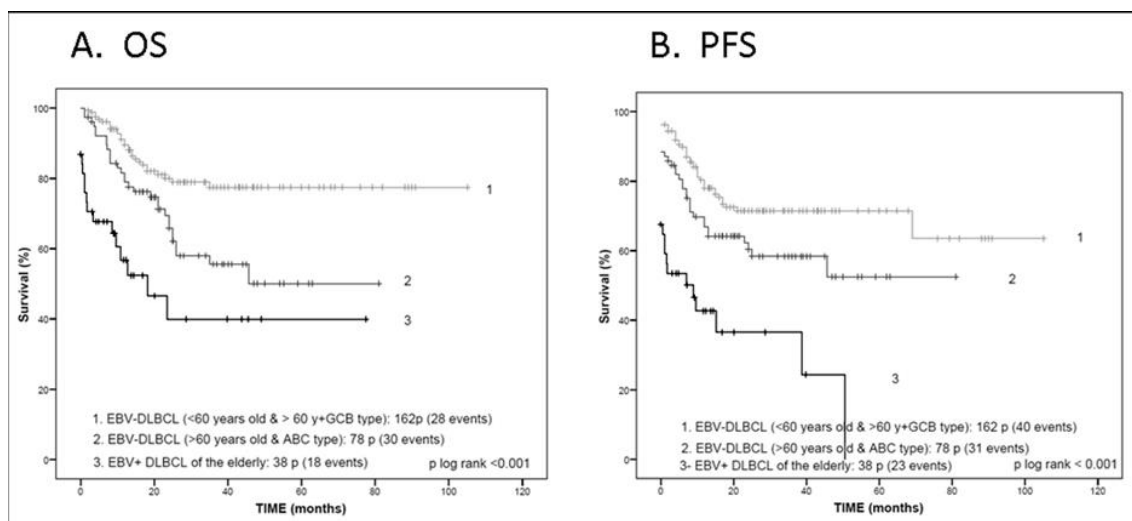


Figura 14. El linfoma B difuso de células grandes EBV positivo asociado a edad avanzada es una neoplasia agresiva con menor supervivencia global y supervivencia libre de progresión que el LBDCG EBV negativo.

Se muestran las curvas de Kaplan-Meier de supervivencia global (OS, de *Overall Survival*) (A) y supervivencia libre de progresión (PFS de *Progression Free Survival*) (B). La supervivencia global estimada a los 2 años fue de  $40 \pm 10\%$  y la supervivencia libre de progresión estimada a los 2 años de  $36 \pm 9\%$ . La comparación con los casos de LBDCG EBV negativos muestra que los casos de LBDCG EBV positivo en pacientes de edad avanzada tienen peor pronóstico que ambos subgrupos de LBDCG, GCB y ABC ( $p$  log rank,  $p < 0.001$ ) e incluso que el subgrupo de LBDCG de tipo ABC en pacientes mayores de 60 años ( $p$  log rank,  $p < 0.001$ ).

#### IV DISCUSION

La identificación de marcadores biológicos de utilidad diagnóstica y pronóstica es un campo en continuo desarrollo en medicina, especialmente en el área de la patología y en concreto en la hematopatología(7, 100). La actual clasificación de las neoplasias linfoides está basada en la integración de los datos clínicos, morfológicos, fenotípicos y moleculares pero es el fenotipo de las neoplasias y su equivalencia con el estado de diferenciación propio de la hipotética célula de origen lo que define cada tipo de neoplasia (por ejemplo, linfoma B folicular, con un fenotipo semejante a las células B foliculares normales). La identificación de nuevos marcadores para cada línea o estado de diferenciación permite refinar en la caracterización de la diversidad, desvelando la heterogeneidad propia de la condición neoplásica.

*GCET1* es un gen sobreexpresado en los casos de linfoma B folicular(1). Estudios previos al nuestro demostraron que el ARNm de *GCET1* se expresaba de forma restringida en células B centrogerminales y en su contrapartida maligna. Estudios de Northern blot mostraron una transcripción restringida a las muestras de ganglio linfático reactivo, la línea celular Raji (derivada de un caso de linfoma de Burkitt) y HL-60 (leucemia promielocítica) y su ausencia en médula ósea timo y bazo así como otras líneas celulares de cáncer(101). Nuestros resultados mostraron ausencia de expresión de la proteína GCET1 en las líneas celulares HL-60 y KG1, lo que es consistente con la ausencia de expresión del gen en células de línea mieloide.

Adicionalmente los resultados en micromatrices de tejidos normales demostraron que la expresión de GCET1 está limitada a un subgrupo de

células B del centro germinal y neoplasias derivadas, estableciendo una diversidad peculiar a las células B del centro germinal, normales y neoplásicas.

GCET1 se expresa exclusivamente en neoplasias derivadas de células B del centro germinal incluyendo el linfoma B folicular (82/89, 92%), el linfoma de Hodgkin de tipo predominio linfocítico nodular, un subgrupo de LBDCG, el linfoma B rico en células T e histiocitos y el linfoma de Burkitt. Ninguno del resto de linfomas B de célula pequeña que se incluyen el diagnóstico diferencial de linfoma B folicular mostró expresión de la proteína, esto es, linfoma B linfocítico de célula pequeña/leucemia linfocítica crónica (20 casos, linfoma esplénico de la zona marginal (19 casos) y linfoma B de célula del manto (19 casos). Este hecho muestra la potencial utilidad de este marcador en la distinción entre linfoma B folicular y otras neoplasias de células B pequeñas no centrogerminales como el linfoma B de la zona marginal y el linfoma del manto, que en ocasiones pueden mostrar un patrón folicular de crecimiento o fenómenos de colonización folicular. Estos resultados, fueron corroborados en una publicación posterior independiente (Paterson y col. Am J Clin Pathol 2008 (102)), utilizando un anticuerpo monoclonal distinto frente a la misma proteína, GCET1.

El hecho de que un número significativo de casos de LF no expresen la proteína GCET1 indica una heterogeneidad imprevista, semejante a la observada en el centro germinal reactivo e implica que la expresión de GCET1 puede mostrar una visión más refinada de los diferentes estados de diferenciación en el centro germinal reactivo y neoplásico. Datos publicados indican que *GCET1* se encuentra sobreexpresado en una firma molecular del

centro germinal asociada con mutación somática persistente (*ongoing SHM*)(44) lo que abre una interesante hipótesis experimental. Consistente con este hecho es conocido que *GCET1* aumenta su transcripción en células B naive estimuladas via CD40(101) por lo que debe formar parte de alguno de los procesos desencadenados por la activación de CD40 (rescate de células B de apoptosis, switch de isotipo, hipermutación somática, maduración de la afinidad e inducción de células B memoria). No obstante el rol exacto de *GCET1* (que muestra una estructura molecular compartida con las serpinas, inhibidores de proteasas(103)) en el inicio y mantenimiento de la reacción centrogerminal mediada por células T es desconocido.

Mayor heterogeneidad en la expresión de *GCET1* se observa en los casos de linfoma de Burkitt y linfoma B Difuso de células grandes. Mediante western blot e inmunohistoquímica demostramos una marcada heterogeneidad en la expresión de *GCET1* por el linfoma de Burkitt y líneas celulares derivadas con casos negativos (incluyendo las líneas celulares AKAYA y RAMOS). El significado de este resultado podría estar en relación con la hipótesis de Bellán y cols. que sugieren que el LB deriva de una célula en dos posibles estados de diferenciación, un centroblasto precoz o una célula B de memoria post-CG(104). Estudios sobre el estado mutacional de los genes VH en células B centrogerminales *GCET1+* podrían aclarar si la expresión se relaciona o no con un estado de hipermutación somática de VH. En LBDCG, el 47% de los casos fueron positivos para *GCET1*. De éstos, los casos clasificados como de tipo GCB por el algoritmo de Hans(57) mostraron con mayor frecuencia expresión de *GCET1* que los clasificados como ABC. La presencia de *GCET1*



(*SERPINA9*) entre los genes sobreexpresados de forma más consistente en todas las firmas de LBDCG de tipo centrogerminal (GCB) generadas a partir de datos de expresión génica(45-47, 105) junto con la disponibilidad de un anticuerpo monoclonal específico ha hecho que la expresión de GCET1 mediante inmunohistoquímica se incorporara a los algoritmos de subclasificación de los casos de LBDCG basados en inmunohistoquímica(58, 106). Así, los algoritmos más recientes que incluyen GCET1 como elemento en la subclasificación del LBDCG en GCB o ABC (Choi, Visco-Young, Tally) alcanzan grados de concordancia con el análisis de perfil de expresión génica (PEG) próximos al 90%(52, 58, 59), sensiblemente superior a la concordancia alcanzada con algoritmos más simples de 3 marcadores de Hans y Muris (próxima al 85%)(57, 59, 107). El impacto pronóstico de estos algoritmos inmunohistoquímicos se ha validado en series independientes de pacientes con LBDCG tratados con R-CHOP(2, 52, 59).

En relación con otros tipos de linfoma B, la proteína GCET1 se encontró sobreexpresada en el 54% de los casos de Linfoma B rico en células T e histiocitos, con un patrón de tinción semejante al del encontrado en la gran mayoría de los casos de linfoma de Hodgkin de tipo predominio linfocítico nodular. Estos datos son consistentes con el origen de estas neoplasias en células B del centro germinal hipermutadas como ha sido demostrado por Brauning y cols.(108, 109). Posteriormente el mismo grupo ha confirmado la similitud en el perfil de expresión génica entre ambas entidades, Hodgkin de tipo predominio linfocítico nodular y Linfoma B rico en células T e histiocitos(110). Adicionalmente hemos encontrado un subgrupo de casos de

linfoma de Hodgkin clásico rico en linfocitos que muestra expresión de GCET1, lo que es consistente con un origen en célula B centrogerminal e insiste en su similitud fenotípica con el Linfoma de Hodgkin de tipo predominio linfocítico nodular(111). Estos resultados fueron confirmados posteriormente en una serie ampliada de casos de linfoma de Hodgkin clásico rico en linfocitos(112).

Los análisis de expresión génica masiva han permitido delinear dos subgrupos moleculares de Linfoma B Difuso de células grandes NOS con impacto clínico en pacientes tratados con la quimioinmunoterapia estándar con R-CHOP. La subclasificación en perfiles de tipo GCB y ABC basada en los perfiles de expresión génica es el estándar para tipificar los casos y en los últimos años se han venido desarrollado diversos métodos y algoritmos basados en la expresión de un número variable de genes que permiten esta subclasificación(45, 46, 105), incluso utilizando material diagnóstico fijado en formol e incluido en parafina(47). Recientemente se ha observado que otro tipo de material génico, en este caso ARNs no codificantes de pequeño tamaño o microARNs pueden servir de biomarcadores para el diagnóstico y pronóstico en neoplasias hematolinfoides(82-84, 113), en parte debido a su expresión diferencial entre diversos estadios de diferenciación de la célula B (72, 74, 85).

Adicionalmente su tamaño relativamente pequeño los hace resistentes a la degradación por ARNasas por lo que pueden ser aislados con relativa facilidad de muestras fijadas en formol e incluidas en parafina como las que se utilizan en los laboratorios de diagnóstico anatomopatológico(114, 115). Su cuantificación mediante PCR a tiempo real a partir de muestras FFIP es factible

y, al igual que en el caso de genes codificantes(53, 116, 117), puede constituir una alternativa a la valoración semicuantitativa de la expresión proteica mediante inmunohistoquímica(118).

Tras un primer paso de identificación de microARNs candidatos se encontró una firma de microARNs relacionados con el estadio de diferenciación según la firma molecular basada en la célula de origen (GCB/ABC)(45). Específicamente encontramos que miR-331, miR-151, miR-28 y miR-454-3p están sobreexpresados en el subtipo GCB de LBDCG mientras que miR-222, miR-144, miR-451 y miR-221 están sobreexpresados en el subtipo ABC(2). Estos datos obtenidos de muestras tisulares de pacientes clasificados según el perfil de expresión génica en GCB o ABC confirman los estudios previos en los que miR222 y miR221 se han encontrado sobreexpresados en líneas celulares de LBDCG de fenotipo ABC como OCI-Ly-10 y OCI-Ly-3(75, 85, 114, 119). Publicaciones posteriores han confirmado esta expresión diferencial entre subgrupos de algunos de estos microARNs en muestras tisulares de LBDCG(69). Esta expresión diferencial entre subgrupos debe estar en relación con la regulación del fenotipo GCB ya que, según nuestro análisis bioinformático in silico, varios de los genes asociados con el fenotipo GCB son potenciales dianas de los microARNs diferencialmente expresados.

Cuando comparamos el impacto pronóstico de ambas clasificaciones, la del modelo basado en la expresión de microARNs y la clasificación GCB/ABC basada en inmunohistoquímica, los dos sistemas resultaron complementarios, de modo que identificaban diferentes grupos de pacientes, en ambos casos con

impacto pronóstico ( $p < 0.001$ , véase tabla suplementaria 4, hoja D de la publicación de referencia(2)).

Así, se ha identificado una firma de microARNs cuya expresión desregulada está asociada con mal pronóstico en pacientes con LBDCG tratados con R-CHOP. Los modelos basados en la expresión de microARNs usando esta expresión como variable continua tienen valor pronóstico tanto para supervivencia global como supervivencia libre de progresión en dos series independientes de pacientes. Esta firma de microARNs predice supervivencia de forma independiente a la subclasificación GCB/ABC. Adicionalmente, estos modelos mejoran la clasificación basada en el índice pronóstico internacional (IPI) de modo que se han generado modelos combinados (IPI y firma de microARNs) que identifican un grupo de pacientes de alto riesgo con supervivencias globales y libres de progresión menores del 50% a los 2 años de seguimiento.

En esta firma de microARNs se encuentran algunas especies de microARNs previamente asociadas con pronóstico en LBDCG(75, 85) y otras que posteriormente se han validado en series clínicas independientes como miR-222(116). Asimismo se ha observado posteriormente que la expresión sérica de miR-222 puede ser de utilidad en la detección precoz del LBDCG en pacientes con infección por HIV(120). La misma firma de microARNs descrita en nuestro trabajo se ha validado recientemente en una serie independiente de pacientes con LBDCG tratados en ensayos clínicos con terapias ajustadas al riesgo clínico(121).

Algunos de estos microARNs regulan genes y vías habitualmente desreguladas en LBDCG como por ejemplo genes relacionados con apoptosis (*MCL1*), ciclo celular (*CDKN1A*), MAPK y NFκB (*MAP3K14*, *MUM1/IRF4*, *CARD10*, *PIM2*), mutación somática durante la reacción centrogerminal (*AID*) y factores de transcripción como *BCL6*. Específicamente miR-221 y miR-222 se han visto implicados en la regulación de ciclo celular inhibiendo p27 (Kip1), un regulador de ciclo celular y gen supresor tumoral. Otros componentes de la firma como los del cluster miR-106b-25 (que incluye miR-93) se han visto relacionados con la regulación de la expresión de *CDKN1A* (p21) y *BCL2L11*, inhibiendo la vía supresora TGF-β en otros cánceres(122) y recientemente en LNH(123). La validación funcional de estas interacciones microARN-gen requiere experimentos de transfección (introducción del microARN y medida del cambio en el ARNm y proteína diana) y silenciamiento (utilizando shARNs para inhibir la expresión constitutiva de los microARNs y medir los cambios en ARNm y proteína derivados) que confirmen la predicción basada en las secuencias de alineamiento entre el microARN y el 3'UTR del gen diana.

Es relevante que la firma pronóstica basada en microARNs identificada aquí es independiente de la subclasificación en GCB/ABC. Aunque esta clasificación molecular del LBDCG tiene un evidente potencial como marcador en la identificación de pacientes que serán tratados con terapias específicas para el subtipo ABC(124, 125), el desarrollo de métodos que identifiquen grupos de pacientes con LBDCG de mal pronóstico es de utilidad en el diseño de ensayos clínicos con terapias ajustadas al riesgo biológico.

**El uso de nuevos marcadores inmunohistoquímicos permite definir con mayor precisión entidades clinicopatológicas concretas dentro de la categoría de linfoma B difuso de célula grande.**

El linfoma plasmablástico se considera actualmente una entidad clinicopatológica precisa en la clasificación vigente de la OMS, siendo incluido en clasificaciones anteriores como variante de LBDCG NOS. Se define como una neoplasia derivada de células B con diferenciación terminal, es decir, que muestra un inmunofenotipo equivalente al de las células plasmáticas. La disponibilidad de nuevos marcadores inmunohistoquímicos asociados a diferenciación plasmocelular puede ayudar a definir un fenotipo característico de esta entidad que permita la distinción con el Linfoma B Difuso de células grandes convencional de tipo ABC.

Nuestros resultados(3) demuestran un fenotipo característico del linfoma plasmablástico con coexpresión de PRDM1/Blimp1 y XBP1s junto con ausencia o niveles bajos de expresión de marcadores de células B (PAX5 y CD20). Este fenotipo es muy inusual en casos de LBDCG NOS con 5 de 111 casos en nuestra serie control. De hecho, después de la reevaluación morfológica e inmunohistoquímica 2 de ellos fueron considerados linfoma plasmablástico. Los otros tres casos pueden pertenecer a la categoría descrita como LBDCG con marcada diferenciación secretora al mantener una expresión intensa de CD20 y PAX5(126). Así, este fenotipo plasmablástico completo (PRDM1/Blimp1 y XBP1s positivos y CD20 y PAX5 débilmente positivos o negativos) ayudan a distinguir estos tumores del linfoma B difuso de célula grande convencional. Estudios posteriores de otros grupos de investigación han encontrado un

fenotipo equivalente en linfomas B ALK positivos, que típicamente muestran una morfología, fenotipo y curso clínico semejantes a los linfomas plasmablásticos aquí estudiados(127).

Este fenotipo, aunque es más frecuente en los casos positivos para el virus de Epstein-Barr también se encuentra en casos EBV negativos. En este sentido EBV se ha visto implicado en la represión del programa de identidad B a través de varios mecanismos como la hipermetilación del promotor de PAX5(128), induciendo al mismo tiempo la activación y acumulación nuclear de XBP1s, mediada por la respuesta denominada de stress del retículo endoplásmico (*ER-stress response*)(129). Otras consecuencias de la expresión de un programa de diferenciación terminal incluyen la pérdida de expresión de MHCII(61), debida a la represión de CIITA por parte de PRDM1/Blimp1(130). Esta regulación de la expresión de MHCII se ha demostrado in situ (en tejido) en un trabajo independiente sobre esta misma serie de casos(131) y en una serie independiente(132). La pérdida de expresión de MHCII podría estar relacionada con el curso clínico desfavorable de estos casos, debido a sus efectos sobre la inmunovigilancia antitumoral como se ha sugerido en la literatura(133).

Algunos casos de morfología plasmablástica muestran un fenotipo plasmablástico variante (defectivo) que puede reflejar los diferentes estadios en la diferenciación terminal gradual de las células B(65) (Figura 15). El descubrimiento de estos fenotipos plasmablásticos, completo y variante es consistente con los hallazgos previos de Balague y cols en relación con la expresión de XBP1s en diferentes tipos de linfoma(66). Estos autores,

utilizando un anticuerpo policlonal que reconoce las formas citoplásmica y nuclear de XBP1s llegaron a conclusiones semejantes a las nuestras en relación con la heterogeneidad en la expresión de XBP1s en linfomas plasmablásticos y el impacto clínico de la expresión de la proteína en LBDCG convencional. Las diferencias en la proporción de casos de LBDCG positivos para XBP1s pueden ser debidas al uso de diferentes anticuerpos, uno monoclonal que reconoce sólo la forma procesada de la proteína en nuestro estudio (véase descripción del monoclonal en referencia(67)) y otro policlonal en el estudio de Balague y cols(66).

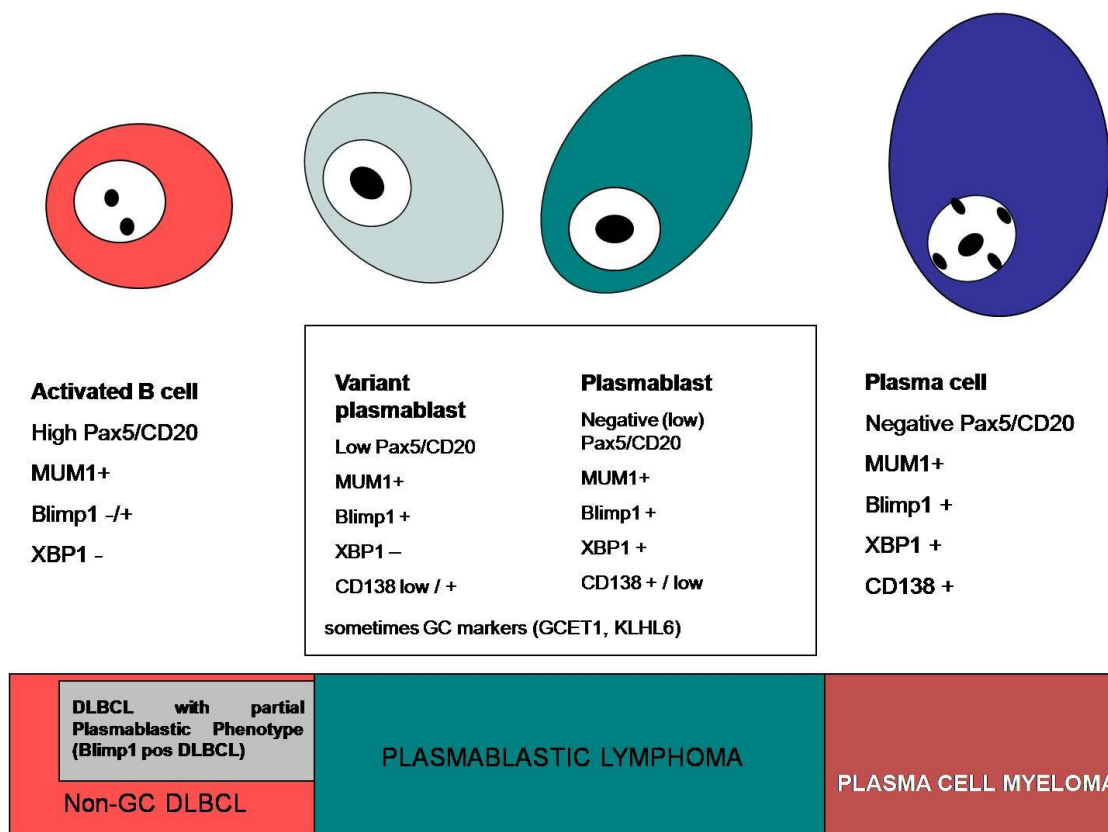


Figura 15 (de referencia(3)): El uso de un panel de IHQ que incluye PAX5, CD20, PRDM1/Blimp1 y XBP1s permite definir un inmunofenotipo plasmablástico que se expresa de forma variable en los casos de linfoma plasmablástico. El grado variable de diferenciación define un espectro de lesiones que abarca desde el linfoma B difuso de células grandes



convencional al linfoma plasmablástico e identifica un grupo de linfomas B agresivos con rasgos fenotípicos intermedios entre linfomas B difuso de células grandes y linfoma plasmablástico (LBDCG con fenotipo plasmablástico parcial).

En relación con la relevancia clínica del diagnóstico de linfoma plasmablástico, se desprende de nuestra serie que este tipo de neoplasia se comporta clínicamente de forma agresiva, responde mal a la terapia y tiene tiempos cortos de supervivencia global y libres de progresión. Existen claras diferencias en relación con tasas de respuesta y supervivencia al compararlo con LBDCG convencional. Incluso cuando se realiza la comparación con la forma no-GCB del LBDCG, la forma más agresiva del LBDCG, las diferencias siguen siendo significativas (figura 10).

Nuestros datos demuestran asimismo una relación entre la adquisición de un fenotipo plasmablástico parcial por parte del LBDCG y la agresividad clínica. Cuando los casos de LBDCG convencional se agrupan en función de la expresión inmunohistoquímica de PRDM1/Blimp1, se identifica un grupo de pacientes de pronóstico intermedio entre el linfoma plasmablástico y el LBDCG convencional PRDM1/Blimp1 negativo. Aunque la expresión de PRDM1/Blimp1 se asocia con un fenotipo no-GCB según el algoritmo de Hans(57), estos casos PRDM1/Blimp1 positivos representan sólo una minoría (28 casos, 34%) en nuestra serie. Existen fenómenos de mutación y represión epigenética de PRDM1/Blimp1 que se encuentran de forma relativamente frecuente en casos de LBDCG (25-32 % de los casos para las mutaciones del gen)(134, 135) y que presumiblemente bloquean la diferenciación terminal en LBDCG. Es probable que los casos que sobreexpresan PRDM1/Blimp1 no presenten estas alteraciones genéticas.

La explicación biológica a la escasa respuesta de los casos de linfoma plasmablástico a las terapias habituales con quimioinmunoterapia con anticuerpos monoclonales antiCD20 podría estar relacionada con la pérdida parcial o completa de marcadores de superficie B(136) asociada a la adquisición de un programa de diferenciación terminal(62). Adicionalmente la pérdida de expresión de MHCII que se observa en estos casos, de forma coordinada con la adquisición de PRDM1/Blimp1 podría jugar un papel en el curso clínico adverso de estos pacientes(132). Recientemente se ha descrito la presencia de reordenamientos de Ig-MYC en un porcentaje significativo de casos de linfoma plasmablástico (próximo al 50%)(137, 138). Este evento, cuando se encuentra asociado a otras anomalías citogenéticas en el contexto de cariotipos complejos, se asocia con curso clínico agresivo en LBDCG(139-141) y podría contribuir a la agresividad intrínseca de esta neoplasia. Así la coexpresión desregulada de C-MYC y Blimp1-XBP1s muestra efectos cooperativos en la inducción de un fenotipo agresivo en el linfoma plasmablástico.

Este programa transcripcional caracterizado por la sobreexpresión de XBP1s y su traslocación nuclear abre una nueva ventana terapéutica al uso de inhibidores del proteosoma que desestabilicen la respuesta de proteínas desplegadas (*unfolded protein response*) en la que está implicada XBP1s(142-144). Así, la inhibición del proteosoma se ha demostrado útil en casos de LBDCG de fenotipo activado(125) y casos aislados de linfoma plasmablástico(145).

Algunas de las entidades clinicopatológicas que recientemente se han aislado del LBDCG NOS tienen carácter provisional en la clasificación vigente de la OMS, debido en parte a la escasa evidencia acumulada sobre sus características clinicopatológicas. Este es el caso del Linfoma B difuso de células grandes asociado a EBV y edad avanzada. Este tipo de linfoma, inicialmente descrito como desorden linfoproliferativo B asociado a EBV y senilidad(35) se considera en parte consecuencia del deterioro inmunológico asociado con la edad avanzada y supone del 8 al 10% de los casos de LBDCG en pacientes del este de Asia, sin inmunodeficiencia previa(36, 37). Sin embargo la evidencia disponible sobre su incidencia y características clínicas, patológicas y fenotípicas en nuestro medio es limitada(38, 39).

Este subtipo emergente de LBDCG se caracteriza por un curso clínico agresivo y un mayor riesgo de fallo del tratamiento que el LBDCG convencional EBV negativo(91) o el linfoma de Hodgkin clásico EBV positivo en pacientes añosos(146). Esta conducta clínica agresiva se ha puesto en relación con las características clínicas de la población afectada ya que se encuentra una relación entre la presencia de EBV y factores de alto riesgo clínico como son la edad avanzada, estadio avanzado, más de una localización extraganglionar, IPI elevado y presencia de síntomas B(91, 146).

Sin embargo hay muy pocos datos sobre las características biológicas de esta neoplasia que expliquen su carácter agresivo o contribuyan a la identificación de marcadores diagnósticos o dianas terapéuticas para esta subpoblación de pacientes de alto riesgo. En nuestro trabajo demostramos que el linfoma B difuso de células grandes EBV positivo asociado a la edad avanzada es una

neoplasia B agresiva con una activación intensa de la vía de NFkB en las células neoplásicas. Esta hiperactivación de la vía está relacionada con la infección por EBV y se da tanto en las formas de tipo GCB como ABC.

La mayoría de los casos recogidos muestran una presentación ganglionar inicial, aunque la presentación extraganglionar se ha descrito como frecuente en series previas(35, 146, 147). Morfológicamente estos tumores muestran una variedad de patrones de crecimiento y diferenciación que deben ser reconocidos para realizar un diagnóstico de sospecha previo a la confirmación con estudios de inmunohistoquímica e hibridación in situ. Todos los casos excepto uno mostraron una histología polimorfa con una marcada variabilidad en el tamaño celular y diferenciación a lo largo del tumor. Se observó una marcada diferenciación inmunoblástica/plasmocitoide en los casos de tipo linfoma B de célula grande y del tipo semejante a desorden linfoproliferativo polimorfo que puede ser una buena clave diagnóstica. El caso de patrón monomorfo mostró características inmunoblásticas también. Esta diferenciación inmunoblástica, junto con áreas de necrosis geográfica han sido descritos como características frecuentes en esta neoplasia(35, 146, 147). Más complejo es el diagnóstico diferencial con linfoma de Hodgkin clásico EBV positivo en pacientes añosos. En nuestra serie hemos utilizado tres criterios sencillos para clasificar el caso como LBDCG EBV positivo en lugar de linfoma de Hodgkin: (1) morfología consistente con desorden linfoproliferativo polimorfo y mayor densidad de células grandes y blastos que la esperada en linfoma de Hodgkin; (2) expresión de marcadores de diferenciación B con expresión moderada o

intensa de CD20 en >50% de la celularidad neoplásica y (3) positividad para EBV-EBER en células grandes e intermedias.

La combinación de determinadas características clínicas y fenotípicas es de utilidad en el reconocimiento de esta entidad. Así el diagnóstico de LBDCG EBV positivo asociado a la edad avanzada se ve favorecido si se encuentra necrosis geográfica, expresión franca de marcadores de línea B como CD20 y CD79, la presencia de restricción de cadenas ligeras(36, 37), expresión de EBNA2 y una marcada reacción citotóxica de células T acompañante(147). Una característica particularmente útil de este tipo de linfoma, atípico en el linfoma de Hodgkin clásico es la variedad de tamaños celulares en las células EBV positivas cuando se identifican con CD20 y EBV-EBER. Hemos utilizado este criterio como válido, de acuerdo con lo descrito para otros desórdenes linfoproliferativos EBV positivos(148). La positividad para CD15, que ha sido considerada durante mucho tiempo como un factor discriminante entre LBDCG y linfoma de Hodgkin clásico(35, 37, 147) se ha encontrado recientemente en lesiones distintas de Hodgkin clásico (particularmente úlceras mucocutáneas EBV positivas(148)), sugiriendo que la presencia o ausencia de CD15 no se debe considerar un factor determinante en este diagnóstico diferencial.

Los estudios de inmunohistoquímica e hibridación in situ cromogénica (HISC) nos han permitido demostrar que EBV está presente en una proporción significativa de la población neoplásica (mediana de 80% mediante HISC). Tanto la hibridación in situ para EBER como la expresión IHQ de EBV-LMP1 son métodos válidos para la detección de EBV pero el primero es más sensible ya que EBV-LMP1 no siempre es positivo y, cuando lo es, se encuentra en un

porcentaje menor de células (Figura 13). Los tumores también mostraron elevada proliferación y sobreexpresión de la proteína antiapoptótica BCL2. Estas dos características pueden estar parcialmente relacionadas con su pronóstico desfavorable como ocurre en series clásicas de LBDCG convencional y linfoma de Hodgkin clásico(100, 149).

En relación con la distinción en los subtipos GCB y ABC de LBDCG, hemos encontrado que los casos de LBDCG EBV positivos asociados a edad avanzada muestran de forma habitual un fenotipo de célula B activada. Adicionalmente hemos descrito la activación de las vías clásica y alternativa de NFkB, determinada por la acumulación nuclear y procesamiento de las proteínas relacionadas con NFkB p105/p50 y p100/p52, en una gran proporción de los casos y con una frecuencia mayor a la observada en muestras pareadas de LBDCG EBV negativo. Además, aunque con el algoritmo de Choi se identifican más casos de fenotipo GCB que con el de Hans en esta serie, ambos tipos, GCB y ABC, muestran actividad incrementada de NFkB. Esta hiperactivación de NFkB provee una base racional para terapias con inhibidores de esta vía(150).

Publicaciones posteriores han confirmado la sobreexpresión de CD30 y subunidades de NFkB como p50 en estas neoplasias en comparación con los LBDCG EBV negativos(151). Adicionalmente se ha corroborado que estos tumores muestran un perfil de expresión génica característico con sobreexpresión de la vía de NFkB y JAK/STAT(151, 152).

Basándonos en nuestros resultados se deduce que la infección por EBV debe jugar un papel directo en la activación de NFkB. Este efecto de EBV en la

activación de NFκB está bien establecido desde el punto de vista experimental. Se sabe que EBV puede inducir respuestas de NFκB mimetizando la señalización de BCR y CD40 a través de las proteínas LMP2A(153, 154) y LMP1(155, 156), respectivamente. Adicionalmente la expresión de EBV-LMP1 induce linfomas B en ratones transgénicos(157). Recientemente se ha confirmado que la infección de líneas celulares de LBDCG con EBV induce, per se, sobreexpresión de NFκB y JAK-STAT(152). Estos datos son consistentes con la escasez de mutaciones en genes que activan de forma patológica la vía de NFκB como MYD-88, CARD11 y CD79B en estos casos(158), lo que sugiere que el efecto transformante de EBV es suficiente para explicar la hiperactivación de NFκB presente en estos tumores.

## **V CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS**

La **hipótesis** de esta tesis doctoral es que la expresión de determinados marcadores biológicos en las muestras tumorales de Linfoma B Difuso de células grandes tiene un impacto en la conducta biológica de estas neoplasias y, por consiguiente, en el pronóstico clínico de los pacientes, en relación con supervivencia global y respuesta a la terapia habitual. Estos marcadores pueden ser de utilidad diagnóstica en la identificación de fenotipos específicos y entidades clinicopatológicas concretas.

Así hemos encontrado que:

- La proteína GCET1 está restringida a un subgrupo de células B del centro germinal y linfomas B derivados del centro germinal. La expresión de esta proteína en muestras diagnósticas se puede utilizar en el reconocimiento del Linfoma B Folicular, Linfoma de Hodgkin de tipo

predominio linfocítico nodular, Linfoma B rico en células T e histiocitos y un subgrupo de linfomas de Hodgkin clásico (LHC, rico en linfocitos). La expresión de GCET1 es de utilidad en el diagnóstico diferencial del linfoma B folicular con el linfoma de la zona marginal y linfoma del manto(1). Posteriormente otros grupos han confirmado la utilidad de la expresión de la proteína GCET1 en la subclasificación pronóstica del LBDCG(52, 58, 59).

- Una firma de microARNs tiene impacto pronóstico en pacientes con LBDCG tratado con quimioinmunoterapia convencional (R-CHOP). La integración de la firma de microARNs con el índice pronóstico internacional (IPI) identifica un subgrupo de pacientes de alto riesgo con una supervivencia global a los dos años menor del 50%. Por lo tanto esta aproximación puede ser de utilidad para refinar la predicción pronóstica en pacientes con LBDCG con la intención de asignar terapias ajustadas al riesgo biológico(2). Esta firma de microARNs ha sido validada en una serie independiente de pacientes tratados en el contexto de ensayos clínicos(121).
- El uso de una combinación restringida de marcadores inmunohistoquímicos (CD20, PAX5, PRDM1/Blimp1 y XBP1s) permite una definición precisa de la diferenciación terminal en linfomas B agresivos y facilita la identificación del fenotipo característico del linfoma plasmablástico. Asimismo se identifica un subgrupo de Linfomas B de células grandes con características fenotípicas intermedias entre LBDCG NOS y linfoma plasmablástico que muestran una conducta clínica agresiva con las terapias convencionales(3).



- El linfoma B difuso de células grandes EBV positivo asociado a la edad avanzada es una neoplasia B clonal, con marcada hiperactivación de la vía de NFkB en las células neoplásicas, independientemente del fenotipo GCB o ABC. El curso clínico es agresivo con limitada supervivencia global y libre de progresión con las terapias estándar. La hiperactivación de NFkB, asociada con la infección por EBV, debe servir de base racional para el diseño de ensayos clínicos con nuevos fármacos para estos pacientes(4).

Así parece demostrado que la caracterización biológica de los casos de linfoma B de célula grande es la base para el desarrollo de terapias más efectivas para los pacientes con mal pronóstico. La insuficiencia de los modelos basados en parámetros clínicos para la identificación precoz de los pacientes refractarios a la terapia y de mal pronóstico estimula la búsqueda de estos marcadores biológicos que idealmente deben ser capaces de predecir la respuesta a la terapia, más allá de tener un valor meramente pronóstico de supervivencia global o libre de progresión. El avance en la subclasificación molecular del LBDCG permitirá en un futuro reciente un abordaje terapéutico personalizado para casos con diferentes alteraciones genéticas de base. De hecho ya se están probando nuevas terapias, actualmente en fase de ensayo clínico que toman ventaja del conocimiento de las características moleculares de los linfomas y tratan de inhibir vías moleculares desreguladas como consecuencia de múltiples alteraciones genéticas, como las vías de NFkB, JAK/STAT, BCR y el eje C-MYC-Blimp1-XBP1s. Por ejemplo, una línea de avance en el tratamiento del LBDCG es el uso de inhibidores de BTK (ibrutinib) en pacientes

con LBDCG refractario de tipo ABC(33, 34). Toda una serie de ensayos preclínicos sugieren diferentes dianas y fármacos específicos para los diversos grupos moleculares de LBDCG(159-161). De este modo se espera que esta subclasificación molecular del LBDCG se incorpore gradualmente al proceso diagnóstico clínico.

## **VI PACIENTES, MATERIALES Y MÉTODOS**

A continuación se enumeran los pacientes, materiales y métodos utilizados en el desarrollo del cuerpo de esta tesis doctoral. Se puede encontrar el detalle en los cuatro manuscritos originales anexos.

1. Cuantificación de la expresión de ARN mensajero. Tecnología basada en micromatrices. Extracción de ARN, preparación del ADNc e hibridación en micromatrices. (1, 2)
2. Análisis de datos de expresión de ARN mensajero. Análisis de expresión diferencial con tejido contrapartida normal. Identificación de vías multigenicas y genes de relevancia funcional (GSEA)(2).
3. Generación de anticuerpos monoclonales dirigidos frente a proteínas de interés. Producción del anticuerpo antiGCET-1.(1)
4. Análisis de expresión de proteínas y ARN en tejido. Proceso de marcaje inmunohistoquímico de las muestras. Valoración de la tinción inmunohistoquímica e hibridación in situ EBV-EBER. Uso de micromatrices de tejido (*tissue microarrays, TMA*) en la valoración inmunohistoquímica y de hibridación in situ de múltiples muestras(1-4).

5. Hibridación in situ fluorescente FISH para la detección de traslocaciones genéticas (C-MYC, BCL2, BCL6)(4).
6. Cuantificación de la expresión de microARNs. Tecnología basada en micromatrices. PCR cuantitativa a tiempo real para la medición de la expresión de microARNs extraídos de tejido parafinado(2).
7. PCR para la detección de clonalidad de IgH, cadenas ligeras y TCR(4).
8. Diseño clínico. Estudios retrospectivos. Recogida de datos clínicos. Formularios de recogida específicos. Objetivos clínicos relevantes (Factores clínicos de riesgo (IPI), Supervivencia Global, Supervivencia libre de Progresión)(2-4).
9. Análisis estadístico. Correlación de los datos de expresión a múltiples niveles (ARN mensajero, proteína, microARNs) con datos de relevancia clínica. Uso de programas estadísticos (SPSS, entre otros). Curvas de supervivencia Kaplan-Meier, Análisis de regresión de Cox uni y multivariante. Generación de modelos pronósticos mutigénicos y en combinación con variables clínicas(2).

## VII BIBLIOGRAFIA

1. Montes-Moreno S, Roncador G, Maestre L, Martinez N, Sanchez-Verde L, Camacho FI, et al. Gcet1 (centerin), a highly restricted marker for a subset of germinal center-derived lymphomas. *Blood*. 2008;111(1):351-8.
2. Montes-Moreno S, Martinez N, Sanchez-Espiridion B, Diaz Uriarte R, Rodriguez ME, Saez A, et al. miRNA expression in diffuse large B-cell lymphoma treated with chemoimmunotherapy. *Blood*. 2011;118(4):1034-40.
3. Montes-Moreno S, Gonzalez-Medina AR, Rodriguez-Pinilla SM, Maestre L, Sanchez-Verde L, Roncador G, et al. Aggressive large B-cell lymphoma with plasma cell differentiation: immunohistochemical characterization of plasmablastic lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma with partial plasmablastic phenotype. *Haematologica*. 2010;95(8):1342-9.
4. Montes-Moreno S, Odqvist L, Diaz-Perez JA, Lopez AB, de Villambrosia SG, Mazorra F, et al. EBV-positive diffuse large B-cell lymphoma of the elderly is an aggressive post-germinal center B-cell neoplasm characterized by prominent nuclear factor-kB activation. *Mod Pathol*. 2012;25(7):968-82.
5. Jaffe ES, Hsu H, Stein H and Vardiman JW. Pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: IARC Press; 2001.
6. Swerdlow SH, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. IARC Press. 2008.
7. Campo E, Swerdlow SH, Harris NL, Pileri S, Stein H, Jaffe ES. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood*. 2011;117(19):5019-32.
8. Laurent C, Do C, Gascoyne RD, Lamant L, Ysebaert L, Laurent G, et al. Anaplastic lymphoma kinase-positive diffuse large B-cell lymphoma: a rare clinicopathologic entity with poor prognosis. *J Clin Oncol*. 2009;27(25):4211-6.
9. Beltran B, Castillo J, Salas R, Quiñones P, Morales D, Hurtado F, et al. ALK-positive diffuse large B-cell lymphoma: report of four cases and review of the literature. *J Hematol Oncol*. 2009;2:11.
10. Reichard KK, McKenna RW, Kroft SH. ALK-positive diffuse large B-cell lymphoma: report of four cases and review of the literature. *Mod Pathol*. 2007;20(3):310-9.
11. Van Roosbroeck K, Cools J, Dierickx D, Thomas J, Vandenberghe P, Stul M, et al. ALK-positive large B-cell lymphomas with cryptic SEC31A-ALK and NPM1-ALK fusions. *Haematologica*. 2010;95(3):509-13.
12. Delsol G, Lamant L, Mariamé B, Pulford K, Dastugue N, Brousset P, et al. A new subtype of large B-cell lymphoma expressing the ALK kinase and lacking the 2; 5 translocation. *Blood*. 1997;89(5):1483-90.
13. Stachurski D, Miron PM, Al-Homsi S, Hutchinson L, Harris NL, Woda B, et al. Anaplastic lymphoma kinase-positive diffuse large B-cell lymphoma with a complex karyotype and cryptic 3' ALK gene insertion to chromosome 4 q22-24. *Hum Pathol*. 2007;38(6):940-5.
14. Llamas-Gutierrez FJ, Deffis Court M, Ponciano Castellanos A, Gonzalez de Cantu K, Aguilar-Guadarrama R, Aguilar Leon D, et al. Anaplastic lymphoma kinase-positive large B-cell lymphoma: a case report with particular immunophenotypic features. *Hum Pathol*. 2013;44(7):1429-33.
15. Sehn LH, Donaldson J, Chhanabhai M, Fitzgerald C, Gill K, Klasa R, et al. Introduction of combined CHOP plus rituximab therapy dramatically improved outcome of diffuse large B-cell lymphoma in British Columbia. *J Clin Oncol*. 2005;23(22):5027-33.
16. Sehn LH, Berry B, Chhanabhai M, Fitzgerald C, Gill K, Hoskins P, et al. The revised International Prognostic Index (R-IPI) is a better predictor of outcome than the standard IPI for patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *Blood*. 2007;109(5):1857-61.

17. Coiffier B. Standard treatment of advanced-stage diffuse large B-cell lymphoma. *Semin Hematol.* 2006;43(4):213-20.
18. Coiffier B. Rituximab therapy in malignant lymphoma. *Oncogene.* 2007;26(25):3603-13.
19. Pfreundschuh M, Trumper L, Osterborg A, Pettengell R, Trneny M, Imrie K, et al. CHOP-like chemotherapy plus rituximab versus CHOP-like chemotherapy alone in young patients with good-prognosis diffuse large-B-cell lymphoma: a randomised controlled trial by the MabThera International Trial (MInT) Group. *Lancet Oncol.* 2006;7(5):379-91.
20. Cheson BD, Pfistner B, Juweid ME, Gascoyne RD, Specht L, Horning SJ, et al. Revised response criteria for malignant lymphoma. *J Clin Oncol.* 2007;25(5):579-86.
21. NCCN. *Ocology Practice Guidelines v 1.2011.*
22. Project TIN-HsLPF. A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project. *N Engl J Med.* 1993;329(14):987-94.
23. Zhou Z, Sehn LH, Rademaker AW, Gordon LI, Lacasce AS, Crosby-Thompson A, et al. An enhanced International Prognostic Index (NCCN-IPI) for patients with diffuse large B-cell lymphoma treated in the rituximab era. *Blood.* 2014;123(6):837-42.
24. Coiffier B, Lepage E, Briere J, Herbrecht R, Tilly H, Bouabdallah R, et al. CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med.* 2002;346(4):235-42.
25. Feugier P, Van Hoof A, Sebban C, Solal-Celigny P, Bouabdallah R, Ferme C, et al. Long-term results of the R-CHOP study in the treatment of elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma: a study by the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte. *J Clin Oncol.* 2005;23(18):4117-26.
26. Habermann TM, Weller EA, Morrison VA, Gascoyne RD, Cassileth PA, Cohn JB, et al. Rituximab-CHOP versus CHOP alone or with maintenance rituximab in older patients with diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol.* 2006;24(19):3121-7.
27. Pfreundschuh M, Schubert J, Ziepert M, Schmits R, Mohren M, Lengfelder E, et al. Six versus eight cycles of bi-weekly CHOP-14 with or without rituximab in elderly patients with aggressive CD20+ B-cell lymphomas: a randomised controlled trial (RICOVER-60). *Lancet Oncol.* 2008;9(2):105-16.
28. Wilson WH, Jung SH, Porcu P, Hurd D, Johnson J, Martin SE, et al. A Cancer and Leukemia Group B multi-center study of DA-EPOCH-rituximab in untreated diffuse large B-cell lymphoma with analysis of outcome by molecular subtype. *Haematologica.* 2012;97(5):758-65.
29. Karlin L, Coiffier B. Improving survival and preventing recurrence of diffuse large B-cell lymphoma in younger patients: current strategies and future directions. *Onco Targets Ther.* 2013;6:289-96.
30. Stiff PJ, Unger JM, Cook JR, Constine LS, Couban S, Stewart DA, et al. Autologous transplantation as consolidation for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med.* 2013;369(18):1681-90.
31. Vose JM. Intensified chemotherapy for diffuse large B-cell lymphomas. *Lancet.* 2011;378(9806):1828-9.
32. Casasnovas RO, Meignan M, Berriolo-Riedinger A, Bardet S, Julian A, Thieblemont C, et al. SUVmax reduction improves early prognosis value of interim positron emission tomography scans in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood.* 2011;118(1):37-43.
33. Davis RE, Ngo VN, Lenz G, Tolar P, Young RM, Romesser PB, et al. Chronic active B-cell-receptor signalling in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature.* 2010;463(7277):88-92.
34. Wyndham H, Wilson M, PhD, John F. Gerecitano, MD, PhD, Andre Goy, MD, Sven de Vos, MD, PhD, Vaishalee P. Kenkre, MD, Paul M. Barr, MD, Kristie A. Blum, MD, Andrei R. Shustov, MD, Ranjana H. Advani, MD, Jason Lih, PhD, Mickey Williams, PhD, Roland Schmitz,

- PhD, Yandan Yang, PhD, Stefania Pittaluga, MD, PhD, George Wright, PhD, Lori A. Kunkel, MD, Jesse McGreivy, MD, Sriram Balasubramanian, PhD, Mei Cheng, PhD, Davina Moussa, Joseph J. Buggy, PhD and Louis M. Staudt, MD, PhD. The Bruton's Tyrosine Kinase (BTK) Inhibitor, Ibrutinib (PCI-32765), Has Preferential Activity in the ABC Subtype of Relapsed/Refractory De Novo Diffuse Large B-Cell Lymphoma (DLBCL): Interim Results of a Multicenter, Open-Label, Phase 2 Study. *Blood*. 54th ASH Annual Meeting Abstracts; 2012.
35. Oyama T, Ichimura K, Suzuki R, Suzumiya J, Ohshima K, Yatabe Y, et al. Senile EBV+ B-cell lymphoproliferative disorders: a clinicopathologic study of 22 patients. *Am J Surg Pathol*. 2003;27(1):16-26.
  36. Shimoyama Y, Yamamoto K, Asano N, Oyama T, Kinoshita T, Nakamura S. Age-related Epstein-Barr virus-associated B-cell lymphoproliferative disorders: special references to lymphomas surrounding this newly recognized clinicopathologic disease. *Cancer Sci*. 2008;99(6):1085-91.
  37. Oyama T, Yamamoto K, Asano N, Oshiro A, Suzuki R, Kagami Y, et al. Age-related EBV-associated B-cell lymphoproliferative disorders constitute a distinct clinicopathologic group: a study of 96 patients. *Clin Cancer Res*. 2007;13(17):5124-32.
  38. Dojcinov SD, Venkataraman G, Pittaluga S, Wlodarska I, Schragger JA, Raffeld M, et al. Age-related EBV-associated lymphoproliferative disorders in the Western population: a spectrum of reactive lymphoid hyperplasia and lymphoma. *Blood*. 2011;117(18):4726-35.
  39. Hofscheier A, Ponciano A, Bonzheim I, Adam P, Lome-Maldonado C, Vela T, et al. Geographic variation in the prevalence of Epstein-Barr virus-positive diffuse large B-cell lymphoma of the elderly: a comparative analysis of a Mexican and a German population. *Mod Pathol*. 2011;24(8):1046-54.
  40. Ott G, Ziepert M, Klapper W, Horn H, Szczepanowski M, Bernd HW, et al. Immunoblastic morphology but not the immunohistochemical GCB/nonGCB classifier predicts outcome in diffuse large B-cell lymphoma in the RICOVER-60 trial of the DSHNHL. *Blood*. 2010;116(23):4916-25.
  41. Feller A, Diebold J. *Histopathology of Nodal and Extranodal Non-Hodgkin's Lymphomas Berlin Heidelberg New York: Springer Verlag; 2004.*
  42. Alizadeh A, Eisen M, Davis RE, Ma C, Sabet H, Tran T, et al. The lymphochip: a specialized cDNA microarray for the genomic-scale analysis of gene expression in normal and malignant lymphocytes. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1999;64:71-8.
  43. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*. 2000;403(6769):503-11.
  44. Lossos IS, Alizadeh AA, Eisen MB, Chan WC, Brown PO, Botstein D, et al. Ongoing immunoglobulin somatic mutation in germinal center B cell-like but not in activated B cell-like diffuse large cell lymphomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(18):10209-13.
  45. Wright G, Tan B, Rosenwald A, Hurt EH, Wiestner A, Staudt LM. A gene expression-based method to diagnose clinically distinct subgroups of diffuse large B cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(17):9991-6.
  46. Rosenwald A, Wright G, Chan WC, Connors JM, Campo E, Fisher RI, et al. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med*. 2002;346(25):1937-47.
  47. Scott DW, Wright GW, Williams PM, Lih CJ, Walsh W, Jaffe ES, et al. Determining cell-of-origin subtypes of diffuse large B-cell lymphoma using gene expression in formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *Blood*. 2014;123(8):1214-7.
  48. Lossos IS, Czerwinski DK, Alizadeh AA, Wechser MA, Tibshirani R, Botstein D, et al. Prediction of survival in diffuse large-B-cell lymphoma based on the expression of six genes. *N Engl J Med*. 2004;350(18):1828-37.

49. Lenz G, Staudt LM. Aggressive lymphomas. *N Engl J Med*. 2010;362(15):1417-29.
50. Lenz G, Wright G, Dave SS, Xiao W, Powell J, Zhao H, et al. Stromal gene signatures in large-B-cell lymphomas. *N Engl J Med*. 2008;359(22):2313-23.
51. Gutiérrez-García G, Cardesa-Salzmann T, Climent F, González-Barca E, Mercadal S, Mate JL, et al. Gene-expression profiling and not immunophenotypic algorithms predicts prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with immunochemotherapy. *Blood*. 2011;117(18):4836-43.
52. Visco C, Li Y, Xu-Monette ZY, Miranda RN, Green TM, Li Y, et al. Comprehensive gene expression profiling and immunohistochemical studies support application of immunophenotypic algorithm for molecular subtype classification in diffuse large B-cell lymphoma: a report from the International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program Study. *Leukemia*. 2012;26(9):2103-13.
53. Malumbres R, Chen J, Tibshirani R, Johnson NA, Sehn LH, Natkunam Y, et al. Paraffin-based 6-gene model predicts outcome in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with R-CHOP. *Blood*. 2008;111(12):5509-14.
54. Monti S, Savage KJ, Kutok JL, Feuerhake F, Kurtin P, Mihm M, et al. Molecular profiling of diffuse large B-cell lymphoma identifies robust subtypes including one characterized by host inflammatory response. *Blood*. 2005;105(5):1851-61.
55. Chen L, Monti S, Juszczynski P, Daley J, Chen W, Witzig TE, et al. SYK-dependent tonic B-cell receptor signaling is a rational treatment target in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 2008;111(4):2230-7.
56. Chen L, Monti S, Juszczynski P, Ouyang J, Chapuy B, Neuberger D, et al. SYK inhibition modulates distinct PI3K/AKT- dependent survival pathways and cholesterol biosynthesis in diffuse large B cell lymphomas. *Cancer Cell*. 2013;23(6):826-38.
57. Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, Gascoyne RD, Delabie J, Ott G, et al. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood*. 2004;103(1):275-82.
58. Choi WW, Weisenburger DD, Greiner TC, Piris MA, Banham AH, Delabie J, et al. A new immunostain algorithm classifies diffuse large B-cell lymphoma into molecular subtypes with high accuracy. *Clin Cancer Res*. 2009;15(17):5494-502.
59. Meyer PN, Fu K, Greiner TC, Smith LM, Delabie J, Gascoyne RD, et al. Immunohistochemical methods for predicting cell of origin and survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab. *J Clin Oncol*. 2011;29(2):200-7.
60. Delecluse HJ, Anagnostopoulos I, Dallenbach F, Hummel M, Marafioti T, Schneider U, et al. Plasmablastic lymphomas of the oral cavity: a new entity associated with the human immunodeficiency virus infection. *Blood*. 1997;89(4):1413-20.
61. Shaffer AL, Lin KI, Kuo TC, Yu X, Hurt EM, Rosenwald A, et al. Blimp-1 orchestrates plasma cell differentiation by extinguishing the mature B cell gene expression program. *Immunity*. 2002;17(1):51-62.
62. Shapiro-Shelef M, Calame K. Regulation of plasma-cell development. *Nat Rev Immunol*. 2005;5(3):230-42.
63. Garcia JF, Roncador G, Garcia JF, Sanz AI, Maestre L, Lucas E, et al. PRDM1/BLIMP-1 expression in multiple B and T-cell lymphoma. *Haematologica*. 2006;91(4):467-74.
64. Shaffer AL, Shapiro-Shelef M, Iwakoshi NN, Lee AH, Qian SB, Zhao H, et al. XBP1, downstream of Blimp-1, expands the secretory apparatus and other organelles, and increases protein synthesis in plasma cell differentiation. *Immunity*. 2004;21(1):81-93.
65. Kallies A, Hasbold J, Fairfax K, Pridans C, Emslie D, McKenzie BS, et al. Initiation of plasma-cell differentiation is independent of the transcription factor Blimp-1. *Immunity*. 2007;26(5):555-66.

66. Balague O, Mozos A, Martinez D, Hernandez L, Colomo L, Mate JL, et al. Activation of the endoplasmic reticulum stress-associated transcription factor x box-binding protein-1 occurs in a subset of normal germinal-center B cells and in aggressive B-cell lymphomas with prognostic implications. *Am J Pathol.* 2009;174(6):2337-46.
67. Maestre L, Tooze R, Canamero M, Montes-Moreno S, Ramos R, Doody G, et al. Expression pattern of XBP1(S) in human B-cell lymphomas. *Haematologica-the Hematology Journal.* 2009;94(3):419-22.
68. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell.* 2004;116(2):281-97.
69. Jima DD, Zhang J, Jacobs C, Richards KL, Dunphy CH, Choi WW, et al. Deep sequencing of the small RNA transcriptome of normal and malignant human B cells identifies hundreds of novel microRNAs. *Blood.* 2010;116(23):e118-27.
70. Calabrese JM, Seila AC, Yeo GW, Sharp PA. RNA sequence analysis defines Dicer's role in mouse embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(46):18097-102.
71. Cummins JM, He Y, Leary RJ, Pagliarini R, Diaz LA, Jr., Sjoblom T, et al. The colorectal microRNAome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(10):3687-92.
72. Basso K, Sumazin P, Morozov P, Schneider C, Maute RL, Kitagawa Y, et al. Identification of the human mature B cell miRNome. *Immunity.* 2009;30(5):744-52.
73. Xiao C, Calado DP, Galler G, Thai TH, Patterson HC, Wang J, et al. MiR-150 controls B cell differentiation by targeting the transcription factor c-Myb. *Cell.* 2007;131(1):146-59.
74. Zhang J, Jima DD, Jacobs C, Fischer R, Gottwein E, Huang G, et al. Patterns of microRNA expression characterize stages of human B-cell differentiation. *Blood.* 2009;113(19):4586-94.
75. Malumbres R, Sarosiek KA, Cubedo E, Ruiz JW, Jiang X, Gascoyne RD, et al. Differentiation stage-specific expression of microRNAs in B lymphocytes and diffuse large B-cell lymphomas. *Blood.* 2009;113(16):3754-64.
76. Costinean S, Zanesi N, Pekarsky Y, Tili E, Volinia S, Heerema N, et al. Pre-B cell proliferation and lymphoblastic leukemia/high-grade lymphoma in E(mu)-miR155 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(18):7024-9.
77. Medina R, Zaidi SK, Liu CG, Stein JL, van Wijnen AJ, Croce CM, et al. MicroRNAs 221 and 222 bypass quiescence and compromise cell survival. *Cancer Res.* 2008;68(8):2773-80.
78. Gupta-Rossi N, Storck S, Griebel PJ, Reynaud CA, Weill JC, Dahan A. Specific over-expression of deltex and a new Kelch-like protein in human germinal center B cells. *Mol Immunol.* 2003;39(13):791-9.
79. Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature.* 2005;435(7043):834-8.
80. Yanaihara N, Caplen N, Bowman E, Seike M, Kumamoto K, Yi M, et al. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell.* 2006;9(3):189-98.
81. Ji J, Shi J, Budhu A, Yu Z, Forgues M, Roessler S, et al. MicroRNA expression, survival, and response to interferon in liver cancer. *N Engl J Med.* 2009;361(15):1437-47.
82. Garzon R, Volinia S, Liu CG, Fernandez-Cymering C, Palumbo T, Pichiorri F, et al. MicroRNA signatures associated with cytogenetics and prognosis in acute myeloid leukemia. *Blood.* 2008;111(6):3183-9.
83. Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, Di Leva G, Shimizu M, Wojcik SE, et al. A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 2005;353(17):1793-801.
84. Marcucci G, Radmacher MD, Maharry K, Mrozek K, Ruppert AS, Paschka P, et al. MicroRNA expression in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2008;358(18):1919-28.



85. Lawrie CH, Chi J, Taylor S, Tramonti D, Ballabio E, Palazzo S, et al. Expression of microRNAs in diffuse large B cell lymphoma is associated with immunophenotype, survival and transformation from follicular lymphoma. *J Cell Mol Med*. 2009;13(7):1248-60.
86. Medina PP, Nolde M, Slack FJ. OncomiR addiction in an in vivo model of microRNA-21-induced pre-B-cell lymphoma. *Nature*. 2010;467(7311):86-90.
87. Kovalchuk O, Filkowski J, Meservy J, Ilnytskyi Y, Tryndyak VP, Chekhun VF, et al. Involvement of microRNA-451 in resistance of the MCF-7 breast cancer cells to chemotherapeutic drug doxorubicin. *Molecular cancer therapeutics*. 2008;7(7):2152-9.
88. Diaz-Uriarte R. SignS: a parallelized, open-source, freely available, web-based tool for gene selection and molecular signatures for survival and censored data. *BMC bioinformatics*. 2008;9:30.
89. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(43):15545-50.
90. Shimoyama Y, Oyama T, Asano N, Oshiro A, Suzuki R, Kagami Y, et al. Senile Epstein-Barr virus-associated B-cell lymphoproliferative disorders: a mini review. *J Clin Exp Hematop*. 2006;46(1):1-4.
91. Park S, Lee J, Ko YH, Han A, Jun HJ, Lee SC, et al. The impact of Epstein-Barr virus status on clinical outcome in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 2007;110(3):972-8.
92. Compagno M, Lim WK, Grunn A, Nandula SV, Brahmachary M, Shen Q, et al. Mutations of multiple genes cause deregulation of NF-kappaB in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature*. 2009;459(7247):717-21.
93. Davis RE, Brown KD, Siebenlist U, Staudt LM. Constitutive nuclear factor kappaB activity is required for survival of activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma cells. *J Exp Med*. 2001;194(12):1861-74.
94. Langerak AW, Groenen PJ, Brüggemann M, Beldjord K, Bellan C, Bonello L, et al. EuroClonality/BIOMED-2 guidelines for interpretation and reporting of Ig/TCR clonality testing in suspected lymphoproliferations. *Leukemia*. 2012;26(10):2159-71.
95. Callan MF, Steven N, Krausa P, Wilson JD, Moss PA, Gillespie GM, et al. Large clonal expansions of CD8+ T cells in acute infectious mononucleosis. *Nat Med*. 1996;2(8):906-11.
96. Ibrahim HA, Menasce LP, Pomplun S, Burke M, Bower M, Naresh KN. Presence of monoclonal T-cell populations in B-cell post-transplant lymphoproliferative disorders. *Mod Pathol*. 2011;24(2):232-40.
97. Cohen JL, Kimura H, Nakamura S, Ko YH, Jaffe ES. Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disease in non-immunocompromised hosts: a status report and summary of an international meeting, 8-9 September 2008. *Ann Oncol*. 2009;20(9):1472-82.
98. Bharadwaj M, Burrows SR, Burrows JM, Moss DJ, Catalina M, Khanna R. Longitudinal dynamics of antigen-specific CD8+ cytotoxic T lymphocytes following primary Epstein-Barr virus infection. *Blood*. 2001;98(8):2588-9.
99. Lenz G, Wright G, Dave S, Kohlmann A, Xiao W, Powell J, et al. Gene Expression Signatures Predict Overall Survival in Diffuse Large B Cell Lymphoma Treated with Rituximab and Chop-Like Chemotherapy. *ASH Annual Meeting Abstracts*. 2007;110(11):348-.
100. Lossos IS, Morgensztern D. Prognostic biomarkers in diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol*. 2006;24(6):995-1007.
101. Frazer JK, Jackson DG, Gaillard JP, Lutter M, Liu YJ, Banchereau J, et al. Identification of centerin: a novel human germinal center B cell-restricted serpin. *Eur J Immunol*. 2000;30(10):3039-48.
102. Paterson MA, Hosking PS, Coughlin PB. Expression of the serpin centerin defines a germinal center phenotype in B-cell lymphomas. *Am J Clin Pathol*. 2008;130(1):117-26.

103. Paterson MA, Horvath AJ, Pike RN, Coughlin PB. Molecular characterization of centerin, a germinal centre cell serpin. *Biochem J.* 2007;405(3):489-94.
104. Bellan C, Lazzi S, Hummel M, Palumbo N, de Santi M, Amato T, et al. Immunoglobulin gene analysis reveals 2 distinct cells of origin for EBV-positive and EBV-negative Burkitt lymphomas. *Blood.* 2005;106(3):1031-6.
105. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature.* 2000;403(6769):503-11.
106. Meyer PN, Fu K, Greiner TC, Smith LM, Delabie J, Gascoyne RD, et al. Immunohistochemical methods for predicting cell of origin and survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab. *J Clin Oncol.* 2011;29(2):200-7.
107. Muris JJ, Meijer CJ, Vos W, van Krieken JH, Jiwa NM, Ossenkoppele GJ, et al. Immunohistochemical profiling based on Bcl-2, CD10 and MUM1 expression improves risk stratification in patients with primary nodal diffuse large B cell lymphoma. *J Pathol.* 2006;208(5):714-23.
108. Brauning A, Kuppers R, Spieker T, Siebert R, Strickler JG, Schlegelberger B, et al. Molecular analysis of single B cells from T-cell-rich B-cell lymphoma shows the derivation of the tumor cells from mutating germinal center B cells and exemplifies means by which immunoglobulin genes are modified in germinal center B cells. *Blood.* 1999;93(8):2679-87.
109. Braeuninger A, Kuppers R, Strickler JG, Wacker HH, Rajewsky K, Hansmann ML. Hodgkin and Reed-Sternberg cells in lymphocyte predominant Hodgkin disease represent clonal populations of germinal center-derived tumor B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(17):9337-42.
110. Brune V, Tiacci E, Pfeil I, Doring C, Eckerle S, van Noesel CJ, et al. Origin and pathogenesis of nodular lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma as revealed by global gene expression analysis. *J Exp Med.* 2008;205(10):2251-68.
111. Delabie J, Vandenberghe E, Kennes C, Verhoef G, Foschini MP, Stul M, et al. Histiocyte-rich B-cell lymphoma. A distinct clinicopathologic entity possibly related to lymphocyte predominant Hodgkin's disease, paragranuloma subtype. *Am J Surg Pathol.* 1992;16(1):37-48.
112. Nam-Cha SH, Montes-Moreno S, Salcedo MT, Sanjuan J, Garcia JF, Piris MA. Lymphocyte-rich classical Hodgkin's lymphoma: distinctive tumor and microenvironment markers. *Modern Pathology.* 2009;22(8):1006-15.
113. Di Lisio L, Martinez N, Montes-Moreno S, Piris-Villaespesa M, Sanchez-Beato M, Piris MA. The role of miRNAs in the pathogenesis and diagnosis of B-cell lymphomas. *Blood.* 2012;120(9):1782-90.
114. Lawrie CH, Soneji S, Marafioti T, Cooper CD, Palazzo S, Paterson JC, et al. MicroRNA expression distinguishes between germinal center B cell-like and activated B cell-like subtypes of diffuse large B cell lymphoma. *Int J Cancer.* 2007;121(5):1156-61.
115. Xi Y, Nakajima G, Gavin E, Morris CG, Kudo K, Hayashi K, et al. Systematic analysis of microRNA expression of RNA extracted from fresh frozen and formalin-fixed paraffin-embedded samples. *Rna.* 2007;13(10):1668-74.
116. Alencar AJ, Malumbres R, Kozloski GA, Advani R, Talreja N, Chinichian S, et al. MicroRNAs are independent predictors of outcome in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with R-CHOP. *Clin Cancer Res.* 2011;17(12):4125-35.
117. Alizadeh AA, Gentles AJ, Lossos IS, Levy R. Molecular outcome prediction in diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med.* 2009;360(26):2794-5.
118. de Jong D, Xie W, Rosenwald A, Chhanabhai M, Gaulard P, Klapper W, et al. Immunohistochemical prognostic markers in diffuse large B-cell lymphoma: validation of tissue microarray as a prerequisite for broad clinical applications (a study from the Lunenburg Lymphoma Biomarker Consortium). *J Clin Pathol.* 2009;62(2):128-38.

119. Roehle A, Hoefig KP, Repsilber D, Thorns C, Ziepert M, Wesche KO, et al. MicroRNA signatures characterize diffuse large B-cell lymphomas and follicular lymphomas. *Br J Haematol.* 2008;142(5):732-44.
120. Thapa DR, Hussain SK, Tran WC, D'Souza G, Bream JH, Achenback CJ, et al. Serum microRNAs in HIV-infected individuals as pre-diagnosis biomarkers for AIDS-NHL. *Journal of acquired immune deficiency syndromes.* 2014;66(2):229-37.
121. Montes-Moreno S, Batlle A, de Villambrosia SG, Sanchez-Espiridion B, Cereceda L, Gonzalez-Barca E, et al. Risk adapted high-dose and dose-dense therapies modulate the impact of biological classification in diffuse large B-cell lymphoma prognosis. *Haematologica.* 2014;99(8):e138-41.
122. Petrocca F, Visone R, Onelli MR, Shah MH, Nicoloso MS, de Martino I, et al. E2F1-regulated microRNAs impair TGFbeta-dependent cell-cycle arrest and apoptosis in gastric cancer. *Cancer Cell.* 2008;13(3):272-86.
123. Thapa DR, Li X, Jamieson BD, Martinez-Maza O. Overexpression of microRNAs from the miR-17-92 paralog clusters in AIDS-related non-Hodgkin's lymphomas. *PLoS One.* 2011;6(6):e20781.
124. Dunleavy K, Grant C, Wilson WH. Using biologic predictive factors to direct therapy of diffuse large B-cell lymphoma. *Ther Adv Hematol.* 2013;4(1):43-57.
125. Dunleavy K, Pittaluga S, Czuczman MS, Dave SS, Wright G, Grant N, et al. Differential efficacy of bortezomib plus chemotherapy within molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood.* 2009;113(24):6069-76.
126. Simonitsch-Klupp I, Hauser I, Ott G, Drach J, Ackermann J, Kaufmann J, et al. Diffuse large B-cell lymphomas with plasmablastic/plasmacytoid features are associated with TP53 deletions and poor clinical outcome. *Leukemia.* 2004;18(1):146-55.
127. Valera A, Colomo L, Martinez A, de Jong D, Balague O, Matheu G, et al. ALK-positive large B-cell lymphomas express a terminal B-cell differentiation program and activated STAT3 but lack MYC rearrangements. *Mod Pathol.* 2013;26(10):1329-37.
128. Tierney RJ, Kirby HE, Nagra JK, Desmond J, Bell AI, Rickinson AB. Methylation of transcription factor binding sites in the Epstein-Barr virus latent cycle promoter Wp coincides with promoter down-regulation during virus-induced B-cell transformation. *Journal of virology.* 2000;74(22):10468-79.
129. Lee DY, Sugden B. The LMP1 oncogene of EBV activates PERK and the unfolded protein response to drive its own synthesis. *Blood.* 2008;111(4):2280-9.
130. Piskurich JF, Gilbert CA, Ashley BD, Zhao M, Chen H, Wu J, et al. Expression of the MHC class II transactivator (CIITA) type IV promoter in B lymphocytes and regulation by IFN-gamma. *Mol Immunol.* 2006;43(6):519-28.
131. Schmelz M, Montes-Moreno S, Piris M, Wilkinson ST, Rimsza LM. Lack and/or aberrant localization of major histocompatibility class II (MHCII) protein in plasmablastic lymphoma. *Haematologica.* 2012;97(10):1614-6.
132. Wilkinson ST, Vanpatten KA, Fernandez DR, Brunhoeber P, Garsha KE, Glinsmann-Gibson BJ, et al. Partial plasma cell differentiation as a mechanism of lost major histocompatibility complex class II expression in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood.* 2012;119(6):1459-67.
133. Rimsza LM, Roberts RA, Miller TP, Unger JM, LeBlanc M, Brazier RM, et al. Loss of MHC class II gene and protein expression in diffuse large B-cell lymphoma is related to decreased tumor immunosurveillance and poor patient survival regardless of other prognostic factors: a follow-up study from the Leukemia and Lymphoma Molecular Profiling Project. *Blood.* 2004;103(11):4251-8.

134. Pasqualucci L, Compagno M, Houldsworth J, Monti S, Grunn A, Nandula SV, et al. Inactivation of the PRDM1/BLIMP1 gene in diffuse large B cell lymphoma. *J Exp Med*. 2006;203(2):311-7.
135. Pasqualucci L, Dalla-Favera R. SnapShot: diffuse large B cell lymphoma. *Cancer Cell*. 2014;25(1):132- e1.
136. Johnson NA, Boyle M, Bashashati A, Leach S, Brooks-Wilson A, Sehn LH, et al. Diffuse large B-cell lymphoma: reduced CD20 expression is associated with an inferior survival. *Blood*. 2009;113(16):3773-80.
137. Valera A, Balagué O, Colomo L, Martínez A, Delabie J, Taddesse-Heath L, et al. IG/MYC rearrangements are the main cytogenetic alteration in plasmablastic lymphomas. *Am J Surg Pathol*. 2010;34(11):1686-94.
138. Taddesse-Heath L, Meloni-Ehrig A, Scheerle J, Kelly JC, Jaffe ES. Plasmablastic lymphoma with MYC translocation: evidence for a common pathway in the generation of plasmablastic features. *Mod Pathol*. 2010;23(7):991-9.
139. Johnson NA, Savage KJ, Ludkovski O, Ben-Neriah S, Woods R, Steidl C, et al. Lymphomas with concurrent BCL2 and MYC translocations: the critical factors associated with survival. *Blood*. 2009;114(11):2273-9.
140. Savage KJ, Johnson NA, Ben-Neriah S, Connors JM, Sehn LH, Farinha P, et al. MYC gene rearrangements are associated with a poor prognosis in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with R-CHOP chemotherapy. *Blood*. 2009;114(17):3533-7.
141. Ott G, Rosenwald A, Campo E. Understanding MYC-driven aggressive B-cell lymphomas: pathogenesis and classification. *Blood*. 2013;122(24):3884-91.
142. Obeng EA, Carlson LM, Gutman DM, Harrington WJ, Jr., Lee KP, Boise LH. Proteasome inhibitors induce a terminal unfolded protein response in multiple myeloma cells. *Blood*. 2006;107(12):4907-16.
143. Lee AH, Iwakoshi NN, Glimcher LH. XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response. *Mol Cell Biol*. 2003;23(21):7448-59.
144. Lee AH, Iwakoshi NN, Anderson KC, Glimcher LH. Proteasome inhibitors disrupt the unfolded protein response in myeloma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(17):9946-51.
145. Bose P, Thompson C, Gandhi D, Ghabach B, Ozer H. AIDS-related plasmablastic lymphoma with dramatic, early response to bortezomib. *Eur J Haematol*. 2009;82(6):490-2.
146. Shimoyama Y, Asano N, Kojima M, Morishima S, Yamamoto K, Oyama T, et al. Age-related EBV-associated B-cell lymphoproliferative disorders: diagnostic approach to a newly recognized clinicopathological entity. *Pathol Int*. 2009;59(12):835-43.
147. Asano N, Yamamoto K, Tamaru J, Oyama T, Ishida F, Ohshima K, et al. Age-related Epstein-Barr virus (EBV)-associated B-cell lymphoproliferative disorders: comparison with EBV-positive classic Hodgkin lymphoma in elderly patients. *Blood*. 2009;113(12):2629-36.
148. Dojcinov SD, Venkataraman G, Raffeld M, Pittaluga S, Jaffe ES. EBV positive mucocutaneous ulcer--a study of 26 cases associated with various sources of immunosuppression. *Am J Surg Pathol*. 2010;34(3):405-17.
149. Rassidakis GZ, Medeiros LJ, Vassilakopoulos TP, Viviani S, Bonfante V, Nadali G, et al. BCL-2 expression in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin disease predicts a poorer prognosis in patients treated with ABVD or equivalent regimens. *Blood*. 2002;100(12):3935-41.
150. Staudt LM. Oncogenic activation of NF-kappaB. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010;2(6):a000109.
151. Ok CY, Li L, Xu-Monette ZY, Visco C, Tzankov A, Manyam GC, et al. Prevalence and clinical implications of Epstein-Barr virus infection in de novo diffuse large B-cell lymphoma in Western countries. *Clin Cancer Res*. 2014;20(9):2338-49.

152. Kato H, Karube K, Yamamoto K, Takizawa J, Tsuzuki S, Yatabe Y, et al. Gene expression profiling of Epstein-Barr virus-positive diffuse large B-cell lymphoma of the elderly reveals alterations of characteristic oncogenetic pathways. *Cancer Sci.* 2014;105(5):537-44.
153. Küppers R. B cells under influence: transformation of B cells by Epstein-Barr virus. *Nat Rev Immunol.* 2003;3(10):801-12.
154. Mancao C, Hammerschmidt W. Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A is a B-cell receptor mimic and essential for B-cell survival. *Blood.* 2007;110(10):3715-21.
155. Brown KD, Hostager BS, Bishop GA. Differential signaling and tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) degradation mediated by CD40 and the Epstein-Barr virus oncoprotein latent membrane protein 1 (LMP1). *J Exp Med.* 2001;193(8):943-54.
156. Thornburg NJ, Kulwichit W, Edwards RH, Shair KH, Bendt KM, Raab-Traub N. LMP1 signaling and activation of NF-kappaB in LMP1 transgenic mice. *Oncogene.* 2006;25(2):288-97.
157. Kulwichit W, Edwards RH, Davenport EM, Baskar JF, Godfrey V, Raab-Traub N. Expression of the Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces B cell lymphoma in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(20):11963-8.
158. Gebauer N, Gebauer J, Hardel TT, Bernard V, Biersack H, Lehnert H, et al. Prevalence of targetable oncogenic mutations and genomic alterations in Epstein-Barr Virus-associated diffuse large B-cell lymphoma of the elderly. *Leuk Lymphoma.* 2014:1-19.
159. Yue Zhang PD, Julie Parmentier, Zhongwu Lai, Ph.D, Greg O'Connor, Melissa Passino, Ph.D., Françoise Powell, Erik Devereaux and Kate Byth, Ph.D. Spleen Tyrosine Kinase Inhibitor Fostamatinib Blocks B Cell Receptor Signaling and Reduces Viability of BCR Subtype Diffuse Large B Cell Lymphoma *Blood.* 54th ASH Annual Meeting Abstracts; 2012.
160. Kian-Huat Lim M, PhD, Donna L. Romero, Divya Chaudhary, Shaughnessy D. Robinson and Louis M. Staudt, MD, PhD. IRAK4 Kinase As A Novel Therapeutic Target in the ABC Subtype of Diffuse Large B Cell Lymphoma *Blood.* 54th ASH Annual Meeting Abstracts; 2012.
161. Heike Keilhack P, Akira Yokoi, PhD, Sarah K Knutson, PhD, Tim Wigle, PhD, Natalie Warholic, Satoshi Kawano, PhD, Yukinori Minoshima, PhD, Kuan-Chun Huang, PhD, Galina Kuznetsov, PhD, Namita Kumar, Christine R Klaus, Christina J Allain, Alejandra Raimondi, PhD, Margaret Porter Scott, PhD, Richard Chesworth, DPhil, Mikel P Moyer, PhD, Toshimitsu Uenaka, PhD, Robert A Copeland, PhD, Victoria M Richon, PhD, Roy M Pollock, PhD and Kevin W Kuntz, PhD. Preclinical Characterization of E7438, a Potent, Selective Inhibitor of Protein Methyltransferase EZH2 with Robust Antitumor Activity Against EZH2 Mutated Non-Hodgkin Lymphoma Xenografts in Mice *Blood.* 54th ASH Annual Meeting Abstracts; 2012.