

**ESTUDIO DEL REORDENAMIENTO DEL ONCOGÉN *BCL-2*  
Y OTROS FACTORES PRONÓSTICOS EN LINFOMAS  
FOLICULARES**

Tesis presentada por  
**Silvia Montoto Almirall**  
para aspirar al grado de Doctora en Medicina

Director de la tesis: Profesor Emili Montserrat Costa

Facultad de Medicina  
Universidad de Barcelona  
Barcelona, Noviembre de 2004

*A Magda, Marijuana, Tani y Caro.*

*A Ángel, José Luis y Javier.*

*Al Profesor Emili Montserrat, director de esta tesis, por  
la confianza demostrada.*

## ***AGRADECIMIENTOS***

A les que van passar de ser companyes de residència a convertir-se en les meves millors amigues: Montse R, Susana R, Ana F, Mireia C, Bet N, Marta G, Débora A. Per haver-me suportat tantes vegades. Per ser amigues meves. I a les extra-hematològiques (Laura V, Mercé P, Mireia P, Neus G), també, pel mateix.

A Armando López-Guillermo porque esta tesis no existiría sin él. Porque me ha enseñado todo lo que sé de linfomas. Por todo lo que me ha ayudado y apoyado durante años. Porque no bromeaba al llamarle “mi maestro”.

A Paco Cervantes y Joan Bladé, mis otros maestros. No solo les debo mis conocimientos hematológicos “no linfomatosos” sino también mi agradecimiento por haber demostrado repetidamente su confianza en mí.

Així mateix, al Jordi Esteve i el Francesc Bosch també els hi dec el seu ajut, recolzament i ensenyances al llarg de tots aquests anys al Servei d' Hematologia.

Y al resto del Servicio de Hematología. Aunque con un contacto menos directo, cada uno a su manera me ha ayudado/animado/soportado en un momento u otro.

A Carme T, M<sup>a</sup> José G i Pedro P per ser tan agradables en el seu ajut en les tasques burocràtiques, tan assistencials com de recerca.

A Isabel, Roser, Eli, M<sup>a</sup> José, M<sup>a</sup> Mar per ajudar-me a disfrutar, encara més, del contacte amb els pacients.

A Dolors Colomer i Bea Bellosillo, que van patir el meu pas pel laboratori.

Al Professor Ciril Rozman. Perque sempre que he necessitat el seu ajut he pogut comptar amb ell.

To Professor Lister and Professor Rohatiner. For trusting me and giving me the opportunity to make real my dream of working at Barts. Thanks to them, what used to be legendary names of international experts on lymphomas become real very, very nice people.

Al Professor Montserrat, director d'aquesta tesi, porque lo anterior no hagués sigut possible sense el seu ferm recolzament.

# ***ÍNDICE***

## **AGRADECIMIENTOS**

## **ÍNDICE**

## **GLOSARIO DE ABREVIATURAS**

## **I. INTRODUCCIÓN**

1.1. Linfoma folicular. Definición y diagnóstico.	2
1.2. Epidemiología.	4
1.3. Origen de las neoplasias linfoides. Etiopatogenia del LF.	5
1.4. Características clínicas e historia natural.	9
1.4.1. Características clínicas e historia natural de los LF de grado III.	15
1.5. Factores pronósticos.	16
1.5.1. Variables clínicas.	16
1.5.2. Factores biológicos.	23
1.6. Tratamiento.	29
1.6.1. Opciones terapéuticas.	30
1.6.2. Tratamiento de primera línea.	45
1.6.3. Tratamiento de rescate.	46

## **II. HIPÓTESIS** 48

## **III. OBJETIVOS**

3.1. Objetivo general.	53
3.2. Objetivos concretos.	53

<b>IV. RESULTADOS</b>	
4.1. Incidencia y significado clínico del reordenamiento <i>BCL-2/IgH</i> en el linfoma folicular.	55
4.1.1. Resumen.	55
4.2. Supervivencia desde la progresión en pacientes con linfoma folicular: análisis de los factores pronósticos.	57
4.2.1. Resumen.	57
4.3. Valor predictivo del “ <i>Follicular Lymphoma International Prognostic Index</i> ” (FLIPI) en pacientes con linfoma folicular en primera recaída.	59
4.3.1. Resumen.	59
<b>V. DISCUSIÓN</b>	61
<b>VI. CONCLUSIONES</b>	69
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA</b>	72



## **GLOSARIO DE ABREVIATURAS**

AcMo	Anticuerpo monoclonal
aloTPH	Trasplante alogénico de progenitores hemopoyéticos
autoTPH	Trasplante autólogo de progenitores hemopoyéticos
<i>BCL-2/BCL-2</i>	Oncogén/proteína <i>B-cell leukemia lymphoma</i>
DR	Duración de la respuesta
EMR	Enfermedad mínima residual
FCG	Linfoma folicular de célula grande
FCPH	Linfoma folicular de célula pequeña hendida
FISH	Hibridación <i>in situ</i> fluorescente
FLIPI	Índice pronóstico internacional para linfomas foliculares
FM	Linfoma folicular mixto
<i>icr</i>	<i>Intermediate cluster region</i>
Ig	Inmunoglobulina
<i>IgH</i>	Gen de la cadena pesada de las inmunoglobulinas
IPI	Índice pronóstico internacional para linfomas agresivos
LDCG	Linfoma difuso de células grandes
LF	Linfoma folicular
LNH	Linfoma no hodgkiniano
<i>MBR</i>	<i>Major breakpoint region</i>
<i>mcr</i>	<i>Minor cluster region</i>
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RC	Respuesta completa
RCm	Respuesta completa molecular

RP	Respuesta parcial
RT	Radioterapia
SB	<i>Southern blot</i>
SDP	Supervivencia desde la progresión
SG	Supervivencia global
SLP	Supervivencia libre de progresión
SMD	Síndrome mielodisplásico

## ***I. INTRODUCCIÓN***

### **1.1. Linfoma folicular. Definición y diagnóstico.**

El linfoma folicular (LF) es un síndrome linfoproliferativo de línea B que se origina a partir de células del centro germinal de los folículos linfoides. Desde un punto de vista morfológico se caracteriza por una proliferación de centrocitos (linfocitos de tamaño pequeño o mediano con núcleo hendido y escaso citoplasma) y centroblastos (células grandes con núcleo redondo u ovalado) que se agrupan en forma de nódulos. En la actual clasificación de la OMS (1) los LF se clasifican según la proporción de centroblastos en: grado I (0-5 centroblastos por campo de gran aumento), II (6-15 centroblastos) y III (> 15 centroblastos), que se corresponden con los subtipos clínicos denominados respectivamente de célula pequeña hendida (FCPH), mixto (FM) y de célula grande (FCG), en la *Working Formulation* (2). El patrón de crecimiento es predominantemente nodular, con folículos de tamaño y forma homogénea, con una zona del manto mal definida, lo que los distingue de folículos de tamaño variable con un manto bien definido presentes en la hiperplasia folicular reactiva. Pese al patrón típicamente nodular, pueden existir áreas difusas en las que suele haber esclerosis que representan focos de transformación a un linfoma más agresivo (3). Las células del LF expresan marcadores de línea B tales como CD19, CD20, CD22, CD79a, así como CD10 y las proteínas BCL-2 y BCL-6 y suelen ser IgS+, CD5-, CD43-. La expresión de la proteína BCL-2 ayuda en el diagnóstico diferencial con la hiperplasia folicular reactiva; sin embargo, no permite distinguir el LF de otros síndromes linfoproliferativos de bajo grado que con frecuencia también la expresan (4-6) [Tabla 1]. En las áreas foliculares se hallan así mismo células foliculares dendríticas CD21+, CD23+ formando un denso entramado. El marcador citogenético característico del LF es la translocación t(14;18)(q32;q21) presente en 70-85% de los casos (7,8), que da lugar al

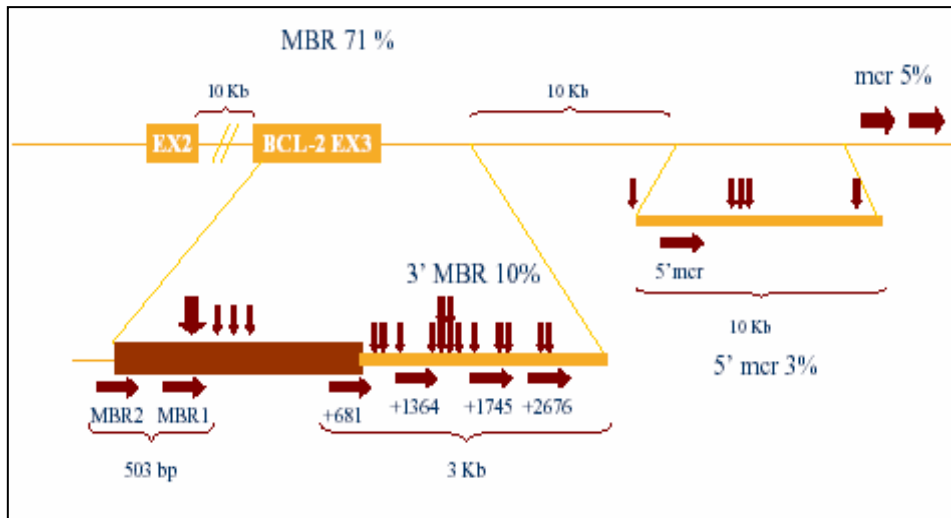
reordenamiento *BCL2/IgH*. El 70% de los puntos de ruptura en el cromosoma 18 se agrupan en una región denominada *MBR* (*major breakpoint region*) y el 5-15% en la región *mcr* (*minor cluster region*) situada a 20 kb de la anterior (9,10). El hecho de que los puntos de ruptura se hallen relativamente agrupados permite que dicho reordenamiento se detecte mediante una técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional en alrededor del 60-75% de los casos (8). En los últimos años, se ha descrito la aparición de una tercera región en la que se agrupan los puntos de ruptura, situada entre *MBR* y *mcr*, que se ha denominado *icr* (*intermediate cluster region*) y que en algunas series es más frecuente que *mcr* (11,12) [Figura 1]. El empleo de técnicas más sensibles que cubren la distancia entre *MBR* y *mcr* como la *long-distance* PCR, FISH en interfase o el uso de cebadores adicionales evitan la aparición de falsos negativos por la existencia de puntos de reordenamiento diferentes de los previamente conocidos. Así, con estas técnicas es posible la detección de hasta un 90-100% de los reordenamientos (13,14).

Tabla 1. Perfil inmunofenotípico de síndromes linfoproliferativos B (6).

	CD20	Igs	CD79b	CD10	CD5	CD23	CD25	CD11c	CD103	BCL-2
LF	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+**
LLP	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+
TLC	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+
LELV	+	+	+	-	-	-	+/-	+/-	+/-	+*
LLC	+*	+*	+/-	-	+	+	-	-	-	+
LCM	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+

LLP: Linfoma linfoplasmocitoide; TLC: Tricoleucemia; LELV: Linfoma esplénico con linfocitos vellosos; LLC: Leucemia linfática crónica; LCM: Linfoma de células del manto; -: ausencia de expresión; +/-: expresión en 25-50% células neoplásicas; +/-: expresión en 50-75% células neoplásicas; +: expresión en >75% células neoplásicas; \* expresión débil; \*\* sobrexpresión.

Figura 1. Puntos de ruptura de la t(14;18)(q32;q21) en el cromosoma 18.



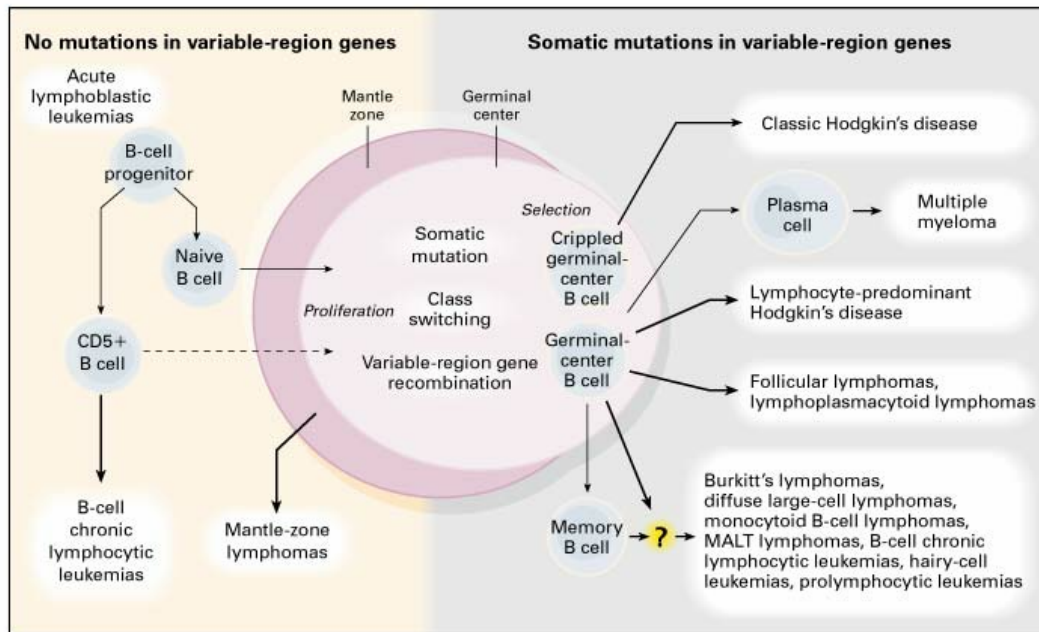
## 1.2. Epidemiología.

El LF constituye el segundo subtipo más frecuente de linfoma no hodgkiniano (LNH) en nuestro medio, tras el linfoma difuso de células grandes. Así, el LF representa el 15% de los linfomas hodgkinianos diagnosticados en un hospital de nuestro medio (15). Sin embargo, esta proporción es sumamente variable según el área geográfica estudiada, de manera que mientras que el LF supone alrededor de un tercio de los linfomas hodgkinianos en países anglosajones, en Asia únicamente representa el 11% de los LNH (16). Cabe destacar que en descendientes de emigrantes asiáticos a los EEUU la proporción de LF aumenta hasta acercarse a cifras similares a las observadas entre los nacidos en dicho país (17). Se ha sugerido una relación entre esta menor proporción de LF en Asia y la menor incidencia de reordenamiento *BCL-2/IgH* en esta zona respecto a la de los países occidentales, sin embargo la proporción de individuos sanos con este reordenamiento es similar en ambos grupos de población, sugiriendo la existencia de diferentes mecanismos patogénicos como causa de la variabilidad geográfica en la incidencia del LF (18).

### ***1.3. Origen de las neoplasias linfoides. Etiopatogenia del LF.***

Las neoplasias linfoides B se originan por la proliferación de linfocitos B detenidos en algún punto durante su proceso de maduración [Figura 2]. El desarrollo de las células linfoides de línea B se inicia con el reordenamiento de su ADN en la médula ósea, mediante un proceso de recombinación de las regiones variables, de diversidad y de unión (V-D-J) del gen de las inmunoglobulinas (Ig). Debido a la variedad de segmentos V, D y J en la línea germinal, este proceso de reordenamiento da lugar a una combinación que es diferente en cada célula B y que codifica una Ig específica para cada clona, que actúa como receptor antigénico de membrana. Una vez las células B “vírgenes” abandonan la médula ósea y reconocen a su antígeno, se acumulan en los centros germinales de los folículos secundarios, donde experimentan nuevas modificaciones en su material genético. Las más características, ya que definen el origen en el centro germinal, son las llamadas hipermutaciones somáticas, que consisten en mutaciones (cambios en un único nucleótido, deleciones o duplicaciones) en la región variable de los genes de las Ig. Mediante estas mutaciones se obtienen anticuerpos con una mayor afinidad por su antígeno. Los linfocitos que no son capaces de producir un anticuerpo funcional son eliminados por un mecanismo de apoptosis. Por el contrario, en las células linfoides que expresan una Ig de superficie eficaz, la expresión de la proteína BCL-2, responsable de la inhibición de la muerte celular programada, las rescata de la apoptosis, permitiendo que dichas células abandonen el centro germinal para convertirse en células B de memoria o diferenciarse en células plasmáticas (4,19,20). Por esta razón, en condiciones fisiológicas no existen células linfoides con expresión de BCL-2 en el centro germinal.

Figura 2. Origen celular de los linfomas (20).

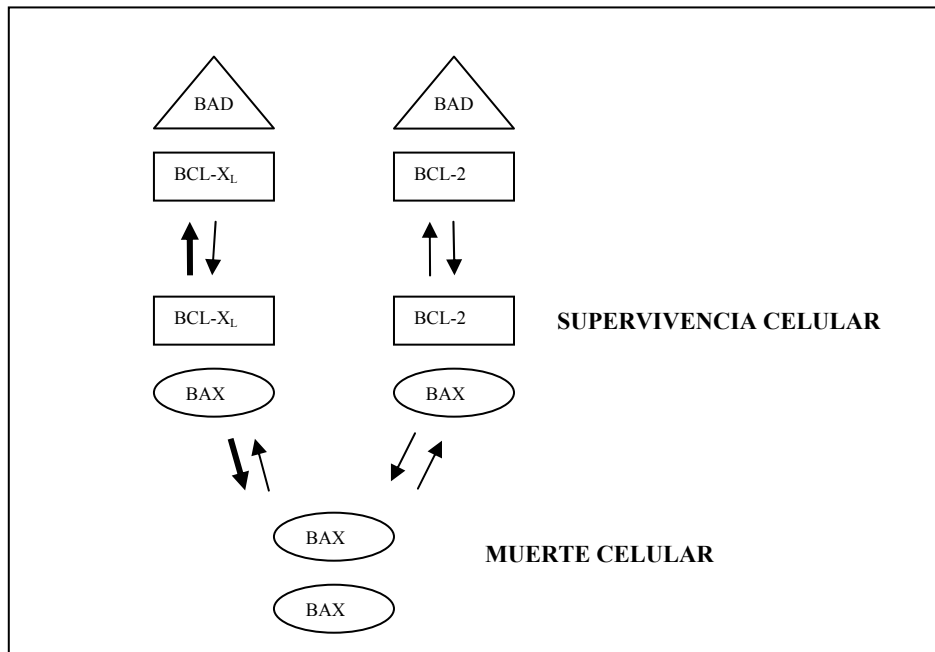


El LF se origina, pues, a partir de las células linfoides que han penetrado en el centro germinal tras haber reconocido a su antígeno correspondiente y que escapan de la apoptosis gracias a la sobreexpresión de *BCL-2* (20). La presencia de mutaciones somáticas en las regiones variables de sus Ig demuestra el origen de las células de los LF en el centro germinal (21,22). El marcador citogenético característico del LF es la translocación  $t(14;18)(q32;q21)$  que da lugar a la yuxtaposición del oncogén *BCL-2*, situado en el cromosoma 18, al gen de la cadena pesada de las inmunoglobulinas que se halla en el cromosoma 14. Esta translocación probablemente se produce por un error durante el proceso de recombinación de las regiones V-D-J (20,23). El reordenamiento *BCL-2/IgH* da lugar a la sobreexpresión de la proteína *BCL-2* ya que el oncogén *BCL-2* queda bajo el efecto de un *enhancer* que radica en el cromosoma 14 (23,24). La proteína *BCL-2* pertenece a una familia de proteínas reguladoras de la apoptosis, es decir, de la muerte celular programada, un proceso básico en el desarrollo de tejidos con un alto recambio celular como el sistema inmune, que precisa un control muy estricto. Las



proteínas de la familia BCL-2 comparten diversas regiones homólogas que son críticas para regular la muerte celular, dado que permiten la homo o heterodimerización con otros miembros de la familia de manera que según el equilibrio resultante se produce un efecto protector o estimulador de la apoptosis (25-27) [Figura 3].

Figura 3. Equilibrio entre las proteínas de la familia de proteínas reguladoras de la apoptosis.



BAX es una proteína promotora de la muerte celular. La heterodimerización de BAX con BCL-2 o BCL-X<sub>L</sub> inhibe la apoptosis. BAD contrarresta el efecto inhibitorio de BCL-X<sub>L</sub> y, en menor medida, de BCL-2.

En el LF la sobreexpresión de BCL-2 provocada por el reordenamiento *BCL-2/IgH* da lugar a una inhibición de la apoptosis con la consiguiente acumulación de células linfoides, lo que favorece la adición de nuevas alteraciones genéticas por daño en el ADN. Aunque se considera el reordenamiento *BCL2-IgH* y la sobreexpresión de BCL-2 resultante como los eventos iniciadores de la linfomagénesis en los LF, estos hechos aislados no son suficientes para dar lugar a la aparición de un linfoma. Dos tipos de evidencia apoyan esta afirmación. Por una parte, experimentos de laboratorio

demuestran que los ratones modificados genéticamente para sobreexpresar BCL-2 desarrollan hiperplasia folicular y únicamente un porcentaje de ellos desarrolla un linfoma tras un periodo de latencia medio de 15 meses; sin embargo, en presencia de translocaciones del oncogén *MYC* este periodo se limita a 3 semanas (28-30). Por otra parte, es posible detectar un reordenamiento *BCL-2/IgH* molecularmente indistinguible del hallado en pacientes con LF en individuos sanos y en tejidos linfoides reactivos. Así, dicho reordenamiento se detecta hasta en un 58% de ganglios con hiperplasia folicular reactiva y en un 28,7% de muestras de sangre periférica (18). Diversos estudios han relacionado la edad (31,32) y el hábito tabáquico (33) con el hallazgo del reordenamiento en individuos sanos, aunque estos datos no se han confirmado en otros análisis (34,35).

En la mayoría de pacientes con LF la sobreexpresión de BCL-2 se supone debida al reordenamiento de su oncogén, pero ello no ocurre así en todos los casos, ya que aproximadamente en un tercio de los casos de LF en los que no se detecta la t(14;18) se observa, por el contrario, sobreexpresión de la proteína BCL-2, probablemente por la existencia de copias extra del gen *BCL-2* (36). Así mismo, el hecho de que otros síndromes linfoproliferativos sobreexpresen BCL-2 en ausencia de reordenamiento apoya la existencia de otros mecanismos implicados, como por ejemplo la hipometilación o mecanismos de regulación post-transcripcional (5,37).

A diferencia de lo que ocurre con otras neoplasias hematológicas en las que existen unos factores etiológicos claramente reconocidos, no se conocen hasta el momento las causas que dan lugar al desarrollo de los LF. Se han publicado múltiples estudios epidemiológicos en los que se asocian factores tales como el tabaquismo (38,39) o la exposición a determinados productos de uso agrícola (40) a un mayor riesgo de padecer un LF, aunque sin una clara evidencia de relación causal.

#### ***1.4. Características clínicas e historia natural.***

Los LF de grado I o II, que constituyen el 70-89% (2,41-43) del total se consideran linfomas indolentes. Por el contrario, el LF de grado III tiene un comportamiento clínicamente más agresivo, que se asemeja al de los linfomas de células grandes, motivo por el cual habitualmente se incluye entre los linfomas agresivos. De hecho, en la *Working Formulation* los FCPH y FM se agrupaban bajo la denominación de “linfomas de bajo grado de malignidad”, mientras que el FCG formaba parte de los “linfomas de grado intermedio” (2). La mayoría de LF tiene, por lo tanto, unas características clínicas y una historia natural indolente. Desde el punto de vista clínico, el LF se caracteriza por aparecer en individuos de edad media o avanzada, de manera que en la mayoría de estudios la edad al diagnóstico se sitúa en la sexta década de la vida (44-46). La distribución según el sexo es bastante equilibrada, aunque dependiendo de las series se observa un ligero predominio masculino (44,45) o femenino (46). Es característica la existencia de enfermedad avanzada al diagnóstico, habitualmente por infiltración medular, hecho que se ha llegado a observar hasta en un 80% de los casos (45-48). Pese al estadio avanzado, los pacientes conservan el estado general y se mantienen ambulantes (ECOG -escala del *Eastern Cooperative Oncology Group*- < 2: 80%). Del mismo modo, solo se observa sintomatología B en un pequeño porcentaje de ellos (45,47,48). En la mayoría de los casos los pacientes consultan por la presencia de adenopatías periféricas, que en ocasiones pueden llevar años de evolución, sin otra sintomatología acompañante. Las adenopatías son de gran tamaño (> 10 cm) en menos de una cuarta de los pacientes (45,47) aunque pueden observarse casos con afección predominante abdominal en los que las adenopatías son de gran tamaño. Aparte de la infiltración medular, la afección extraganglionar no es habitual, siendo el hígado el

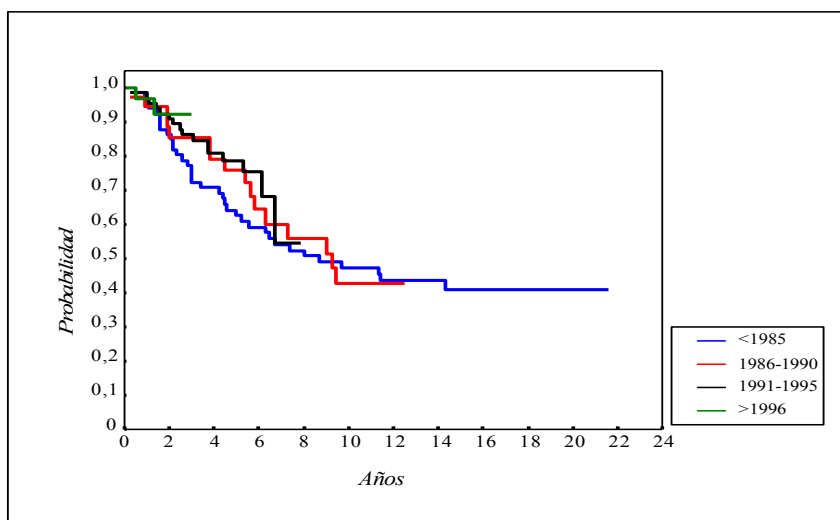
órgano más frecuentemente afectado (45). La infiltración de sangre periférica o leucemización al diagnóstico aparece en menos de un tercio de los pacientes (49-51), si bien cuando se emplean técnicas de citometría de flujo puede detectarse una población clonal en muchos más casos, el significado de la cual no se conoce (52). En cuanto a otras alteraciones analíticas, la existencia de anemia o trombocitopenia es poco frecuente, incluso cuando la médula ósea está infiltrada (47,53,54). La lactodeshidrogenasa sérica (LDH) y la beta2microglobulina ( $\beta$ 2M) están elevadas en el 20% y 30 % de los casos, respectivamente. Clínicamente, pues, los LF se comportan de forma relativamente benigna, de manera que ante la existencia de signos o síntomas más agresivos como la presencia de síntomas B, LDH muy elevada o afección extraganglionar fuera de la médula ósea se ha de sospechar la coexistencia de focos de transformación histológica a un linfoma de alto grado (55). De hecho, no es inusual la presencia de subtipos histológicos diferentes de forma concomitante en un mismo paciente (56).

Las adenopatías pueden ser fluctuantes, apareciendo y desapareciendo durante años antes del diagnóstico. Precisamente es característica de la historia natural de los linfomas indolentes la existencia de remisiones espontáneas. Efectivamente, en aproximadamente un tercio de pacientes no tratados se puede observar una remisión espontánea que, aunque es transitoria, en ocasiones puede ser de una duración considerable (mediana superior al año) (44). También se han observado remisiones espontáneas en pacientes previamente tratados e incluso en casos refractarios al tratamiento (57,58). Pese a que los mecanismos que dan lugar a las remisiones espontáneas en los pacientes con linfoma no son bien conocidos, el hallazgo de anticuerpos anti-tumor recubriendo las células neoplásicas en una paciente con una reducción espontánea de la masa tumoral (59), así como la regresión del tumor en

pacientes que han recibido tratamiento con una vacuna anti-idiotipo (60) sugiere la participación de mecanismos inmunológicos. Así mismo, la desaparición transitoria del linfoma se ha relacionado con la presentación de infecciones víricas o bacterianas (61,62).

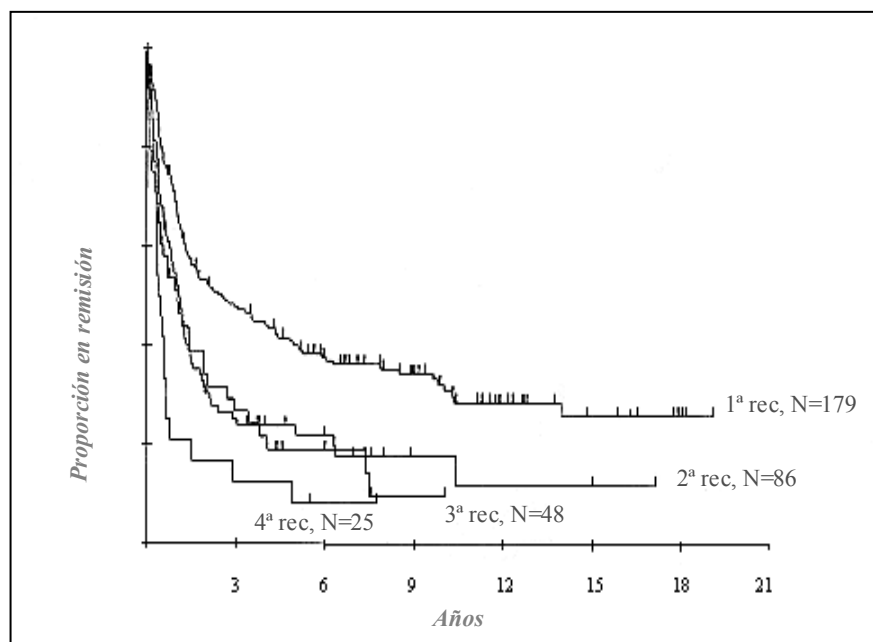
La historia natural de los pacientes con LF se caracteriza por presentar un curso clínico indolente con una alta tasa de respuestas globales con cualquier tratamiento y una supervivencia relativamente prolongada. En efecto, un elevado porcentaje de pacientes, hasta el 80-90%, alcanza una respuesta con el tratamiento de primera línea (63); es más, con la introducción de nuevos agentes tales como los análogos de las purinas o los anticuerpos monoclonales la tasa de respuestas completas (RC) se sitúa en el 80% (64). Así mismo, se ha descrito la existencia de respuestas completas moleculares (RCm) en un alto porcentaje de pacientes tratados con estos fármacos. Sin embargo, pese a los múltiples intentos llevados a cabo en los últimos años con el fin de modificar la historia natural de los pacientes con LF, hasta el momento no se ha observado una mejoría sustancial en el pronóstico de estos pacientes [Figura 4].

Figura 4. Supervivencia global según el año de diagnóstico en 201 pacientes diagnosticados de LF en el Hospital Clínic entre 1977 y 1998.



La mediana de supervivencia en la mayoría de las series se sitúa alrededor de los 10 años (44,45). Sin embargo, pese a la respuesta inicial y la larga supervivencia, la mayoría de pacientes, especialmente aquellos diagnosticados en estadio avanzado, acaban recayendo. Tras la progresión, un elevado porcentaje de pacientes sigue respondiendo al tratamiento (65). Sin embargo, la duración de la respuesta y la supervivencia desde la progresión se van acortando tras las sucesivas recaídas (65) [Figura 5], de manera que la mayoría de los pacientes, tras experimentar varias recaídas, acaba falleciendo por causas relacionadas con el linfoma.

Figura 5. Duración de la respuesta en sucesivas recaídas (Adaptado de Johnson et al. (65)).



Otro aspecto característico de la evolución de los linfomas indolentes es la transformación a un linfoma de alto grado, habitualmente un linfoma difuso de células grandes (LDCG). Tal como se ha mencionado previamente, en los ganglios linfáticos de los pacientes con LF no es inusual la coexistencia de áreas nodulares con áreas difusas,

que representan zonas de transformación, incluso en el momento del diagnóstico. No son bien conocidos los mecanismos que dan lugar a la transformación histológica en los LF, aunque se han implicado diversas alteraciones genéticas, como mutaciones de *p53* (66,67), inactivación de *p16<sup>INK4a</sup>* (68) o reordenamiento de *MYC* (69). La progresión histológica es un fenómeno frecuente, cuya prevalencia varía desde un 12% a un 69% de los casos según las series [Tabla 2]. La duración del seguimiento influye notablemente en la incidencia de transformación histológica, dado que éste es un evento dependiente del tiempo. De este modo, en estudios necroscópicos se demuestra transformación histológica en casi dos tercios de los pacientes (70,71). La variabilidad en la proporción de pacientes que experimentan una transformación histológica en diferentes estudios es debida a varios factores. En primer lugar, la falta de criterios diagnósticos unánimes. Así, mientras que en algunas series se incluyen pacientes diagnosticados en base a las sospechas clínicas o a muestras obtenidas por citología (72,73), en otras únicamente se incluyen pacientes diagnosticados mediante biopsia (44,74). Por otra parte, los criterios histopatológicos para aceptar la existencia de una transformación no son uniformes. En algunas series la transformación se define únicamente por la aparición de un patrón histológico difuso en la biopsia o de cualquier tipo de LNH de alto grado (73), mientras que en otras la progresión de un LF de grado I o II a un LF de grado III también se considera un criterio de transformación (44,74). Otro aspecto que juega un papel importante en la variabilidad de la incidencia de transformación histológica en diferentes estudios es la frecuencia con la que se repiten las biopsias en los pacientes en recaída en diferentes centros. En este sentido, debe considerarse la dificultad para obtener material histológico en muchos de los pacientes en recaída sin adenopatías periféricas, en los que los signos y síntomas clínicos hacen sospechar la transformación a un linfoma de alto grado y en los que, por su mal estado

general, no es posible realizar exploraciones invasivas. La existencia de grandes masas adenopáticas de rápido crecimiento, la presencia de síntomas constitucionales, el nivel sérico de LDH muy elevado y la afección extraganglionar en territorios inhabituales son datos que orientan hacia la existencia de una transformación histológica (55,72,73).

Tabla 2. Incidencia de transformación histológica en pacientes con LF.

	Métodos diagnósticos	Criterios Histológicos	Seguimiento (mediana)	Prevalencia	Probabilidad actuarial
Risdall <sup>(71)</sup>	Bx (necropsia)	Patrón difuso	-	63%	-
Garvin <sup>(70)</sup>	Bx (necropsia)	Patrón difuso	-	69%	-
Horning <sup>(44)</sup>	Bx	Patrón difuso LF de grado III	4 años	12%/18%*	19%/23% (8 años)*
Ersbøll <sup>(74)</sup>	Bx	LF de grado III LNH alto grado	6 años	24%	30% (5 años) 56% (10 años)
Yuen <sup>(73)</sup>	Bx, Cx	LDCG L. difuso mixto LNH alto grado	9 años	NE	NE
Bastion <sup>(72)</sup>	Bx, Cx, Cl	Linfoma difuso agresivo	9 años	24%	22% (5 años) 31% (10 años)

Bx: biopsia tisular; Cx: citología; Cl: sospecha clínica; NE: no especificado; \*sin tratamiento previo/tratados previamente.

La progresión histológica implica mal pronóstico y en muchas ocasiones representa el evento final en la historia natural de los pacientes con LF. La mediana de supervivencia tras la transformación no suele superar el año (72,74). Diversos factores se han asociado a una mejor supervivencia tras la transformación, entre ellos la ausencia de síntomas B, la enfermedad localizada, la normalidad en el nivel sérico de LDH y el tratamiento con regímenes que incluyen adriamicina (72,73). Sin embargo, cuando se incluye la respuesta al tratamiento de rescate en los análisis multivariados, esta variable emerge como la más importante para predecir la supervivencia (72,73). Aunque los



resultados con quimioterapia intensiva y rescate con progenitores hemopoyéticos son esperanzadores, la mayoría de las series publicadas son cortas y muy seleccionadas (75,76).

#### ***1.4.1. Características clínicas e historia natural de los LF de grado III.***

Los LF de grado III presentan un comportamiento diferente del resto de LF. Los criterios de Mann y Berard para clasificar los LF en subtipos histológicos han demostrado su utilidad como herramienta pronóstica, tanto para la supervivencia global (SG) como para la supervivencia libre de progresión (SLP), con una supervivencia más prolongada entre los pacientes con LF de grado I y II, pero con una SLP en éstos acortada respecto a los LF de grado III. Es decir, la evolución de los pacientes con LF de grado III se aproxima más a la de los pacientes con linfomas de alto grado (77-80), que a la de los pacientes con linfoma de bajo grado. En este sentido, el estudio del grupo GELA (*Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte*) demostró la ausencia de diferencias estadísticamente significativas en la SG y en la SLP entre los pacientes con LF de grado III y los pacientes con LDCG tratados de forma uniforme (SG y SLP a los 5 años 58% y 39% para LF de grado III frente a 51% y 43%, respectivamente para LDCG) (81), aunque cabe destacar que en este estudio no se siguieron los criterios de Mann y Berard para el diagnóstico de LF de grado III. En la misma línea, ciertas características clínicas de los LF de grado III, tales como un mayor porcentaje de estadios localizados (82), menor incidencia de infiltración medular (81), y una mayor de proporción de pacientes con síntomas B y con elevación de LDH y  $\beta$ 2M (80,81), se hallan a medio camino entre las típicas de los LNH indolentes y las de los LNH agresivos y son algo más propias de estos últimos.

### **1.5. Factores pronósticos.**

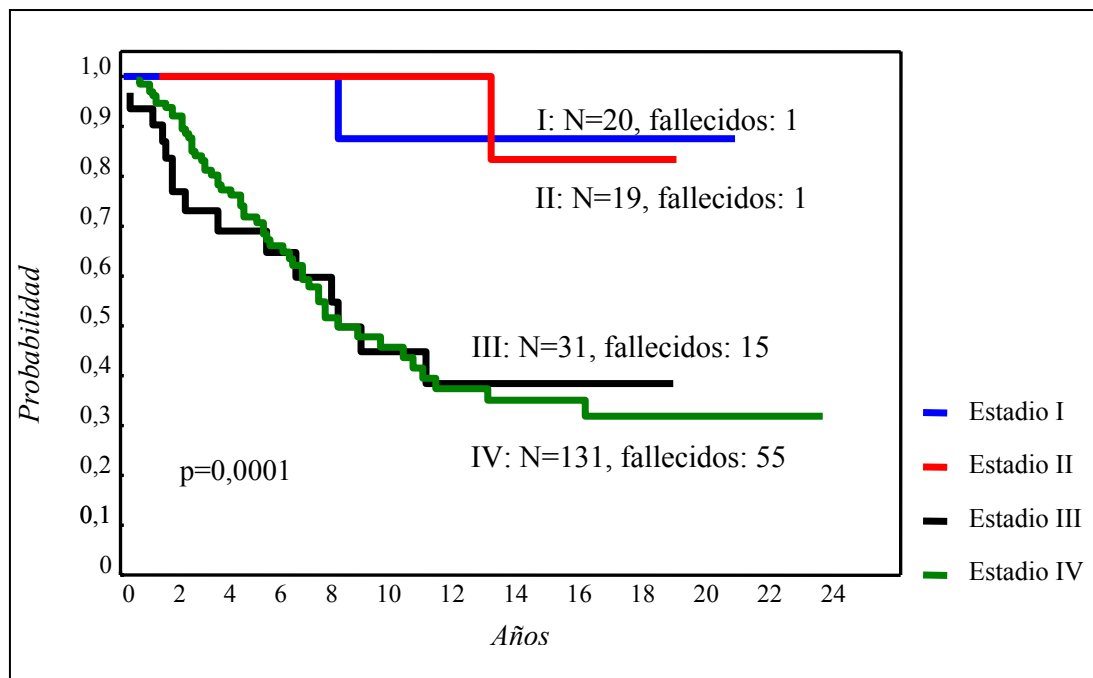
Son innumerables los estudios publicados analizando los factores pronósticos que influyen en el porvenir de los pacientes con LF, la mayoría de los cuales hace referencia a factores predictivos en el momento del diagnóstico. Algunos de estos factores tienen relación con particularidades del paciente, mientras que otros están relacionados con las características del tumor, ya sean histológicas o moleculares. Por otra parte, existen una serie de variables con valor pronóstico que tienen que ver con la respuesta del tumor al tratamiento. Ante la proliferación de múltiples factores pronósticos se han llevado a cabo diversos intentos de diseñar un índice pronóstico equivalente al *International Prognostic Index* (IPI) para linfomas agresivos, con un éxito limitado hasta el momento.

#### **1.5.1. Variables clínicas.**

Un primer grupo de factores con valor predictivo en los pacientes con LF está constituido por variables que dependen de características del paciente. Así, la edad aparece como uno de los factores que influye más notablemente en el pronóstico en la mayoría de las series (47,83-87). Por el contrario, el sexo masculino se asocia a una supervivencia acortada en algunas series (47,50,84,88), pero no en otras (83,85-87,89). Otra variable que influye en el pronóstico de estos pacientes es su estado general o *performance status*, habitualmente valorado según la escala ECOG, de manera que los pacientes con mal estado general al diagnóstico, ya sea atribuible al linfoma o a otras enfermedades concomitantes, presentan un peor pronóstico que el resto (84,85). Así mismo, el pequeño porcentaje de pacientes que presentan síntomas B tienen un pronóstico peor que los pacientes asintomáticos (47,85,87,89).

La extensión de la enfermedad en el momento del diagnóstico es otro factor fundamental que determina la evolución clínica de los enfermos con LNH. El estadio, evaluado según la clasificación de *Ann Arbor*, es la principal variable que cuantifica dicha extensión y uno de los factores con mayor importancia pronóstica en los pacientes con LF, cuando en el análisis se incluyen pacientes diagnosticados tanto en estadio localizado como en estadio avanzado (83-85,90) [Figura 6]. De hecho, la clasificación de los pacientes según se diagnostiquen en estadio localizado (estadio I o II) o avanzado (estadio III o IV) discrimina 2 grupos con un curso clínico y unas posibilidades de curación absolutamente diferentes, lo que determina una actitud terapéutica que difiere sustancialmente en uno y otro grupo de individuos.

Figura 6. Supervivencia global según el estadio en 201 pacientes diagnosticados de LF en el Hospital Clínic entre 1977 y 1998 (90).



Además del estadio, otras variables reflejan la extensión tumoral y se acompañan de valor predictivo en algunos estudios. La infiltración de la médula ósea en el momento del diagnóstico está íntimamente ligada con el estadio por lo que habitualmente pierde su valor significativo en los análisis multivariados, sin embargo el grado de infiltración medular aparece como un importante factor pronóstico en el estudio de Romaguera et al. que incluye únicamente pacientes en estadio IV (50). La leucemización, otro factor relacionado que *a priori* parecería asociarse a un peor pronóstico, no ha mostrado valor predictivo en las escasas series en que se ha analizado (50,87,88). Por el contrario, el número de áreas ganglionares (86,87) o extraganglionares (47,50) afectas sí se ha relacionado con el pronóstico de la enfermedad. Otro parámetro indicativo de la masa tumoral del LF, la existencia de grandes adenopatías, conlleva una evolución adversa en algunas series (50,87,91), si bien la heterogeneidad en la definición de masa voluminosa en diferentes estudios, que oscila entre 5 y 10 cm., dificulta las comparaciones entre ellos. En este sentido el grupo GELF (*Group d'Etude des Lymphomes Folliculaires*) ha definido unos criterios de alta carga tumoral. La presencia de cualquiera de las siguientes circunstancias: síntomas B, signos o síntomas de compresión, una masa voluminosa > 7 cm., la existencia de un derrame seroso, 3 o más áreas ganglionares de  $\geq 3$  cm., esplenomegalia, y la presencia de células linfomatosas en sangre periférica, es considerado un indicador de carga tumoral elevada (92). Por otra parte, existen una serie de datos de laboratorio con importante valor pronóstico que también reflejan la extensión tumoral: así la disminución de la hemoglobina, secundaria a infiltración medular, se asocia a una supervivencia acortada en varios estudios (84,88,89); el nivel sérico de LDH constituye una medida indirecta de la masa tumoral que se ha relacionado con el número de áreas extraganglionares afectas, con el grado de infiltración medular (50) y con el nivel sérico de  $\beta 2M$  (93), pero que ha mostrado su

valor pronóstico de forma independiente en varios estudios multivariados (47,94); por último la  $\beta 2M$ , un marcador de masa y proliferación celular, también ha mostrado importancia como factor predictivo para la supervivencia en pacientes con LF (93).

De forma análoga a lo sucedido con el IPI para linfomas agresivos, convertido en el principal factor pronóstico en estos linfomas, se ha intentado diseñar un índice pronóstico para los pacientes con LF. Así, se han publicado varias propuestas de índice pronóstico (47,50,84,85), en las que destacan unas pocas variables comunes a varios de los índices [Tabla 3], sin que ninguna de estas propuestas haya sido ampliamente aceptada.

Tabla 3. Variables incluidas en diferentes índices pronósticos aplicados al LF.

	<i>Leonard*</i> (1991) <sup>(84)</sup>	<i>Romaguera</i> (1991) <sup>(50)</sup>	<i>Cameron</i> (1993) <sup>(85)</sup>	<i>IPI<sup>#</sup></i> (1994) <sup>(95)</sup>	<i>Federico</i> (2000) <sup>(47)</sup>	<i>FLIPI</i> (2004) <sup>(96)</sup>
<i>Edad</i>	X		X	X	X	X
<i>ECOG</i>	X		X	X		
<i>Estadio</i>	X		X	X		X
<i>Sexo ♂</i>	X				X	
<i>Hb</i>	X					X
<i>Nº áreas extraganglionares</i>		X		X	X	
<i>Tamaño ganglionar</i>		X				
<i>Infiltración MO</i>		X				
<i>Síntomas B</i>			X		X	
<i>Infiltración TGI</i>			X			
<i>LDH elevada</i>				X	X	X
<i>VSG elevada</i>					X	
<i>Nº áreas ganglionares</i>						X

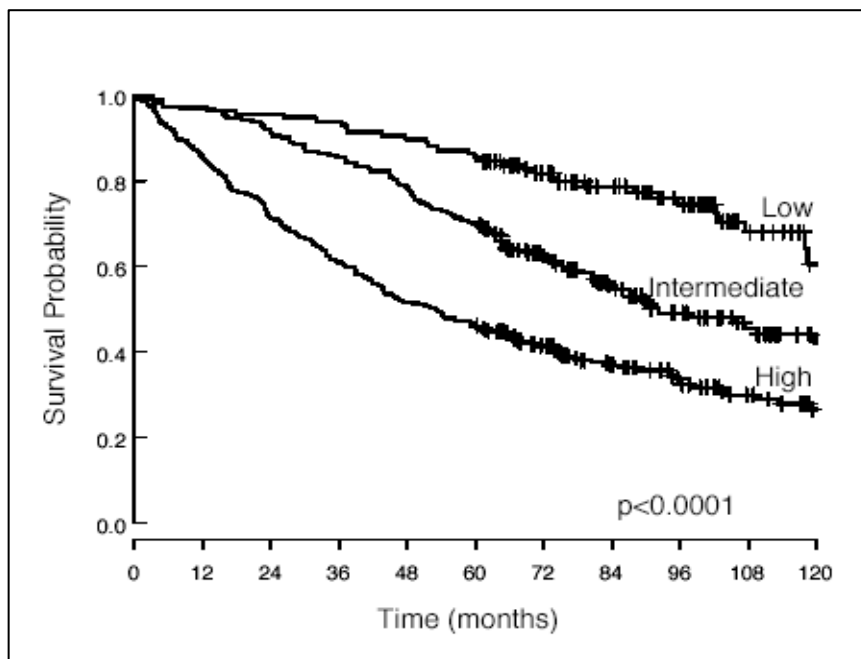
\* para linfomas indolentes; # para linfomas agresivos; MO: médula ósea; TGI: tracto gastrointestinal.

Romaguera et al. describieron en 1991 un índice para pacientes con LF en estadio IV que incluye el número de áreas extraganglionares afectas, el tamaño ganglionar y el grado de infiltración medular. Estas variables permiten clasificar a los pacientes en 3 grupos de riesgo según la carga tumoral sea baja, intermedia o alta, que presentan un supervivencia “relacionada con el linfoma” (*cause-specific survival*) a los 10 años del 73, 40 y 24%, respectivamente. Pese a que mediante este índice se distinguen claramente 3 grupos de pacientes con un pronóstico muy diferente, la relativa complejidad en el cálculo del índice dificulta su aplicación (50). Los índices propuestos por Leonard et al. y Cameron et al. para linfomas indolentes y LF (84,85), respectivamente, tienen el mismo inconveniente puesto que se han de calcular mediante fórmulas matemáticas. Recientemente el ILI (*Italian Lymphoma Intergroup*) ha publicado un modelo predictivo basado en el análisis de los factores pronósticos en 987 pacientes con LF (47). Las variables incluidas en este modelo (edad, sexo, número de áreas extraganglionares afectas, nivel sérico de LDH, presencia de síntomas B y VSG), permiten clasificar a los pacientes en un grupo de bajo riesgo (0-1 factores adversos), de riesgo intermedio (2) o alto ( $\geq 3$  factores), que presentan una supervivencia a los 10 años del 65, 54 y 11%, respectivamente. Los grupos de bajo, intermedio y alto riesgo engloban el 64, 23 y 13% de los pacientes, respectivamente. Por otra parte, el IPI, diseñado específicamente para los pacientes con linfomas agresivos, es capaz de discriminar pacientes con linfoma indolente, incluido el folicular, con distinto pronóstico. Sin embargo, la proporción de enfermos con linfoma folicular que quedan incluidos dentro de la categoría de alto riesgo es baja, lo cual es un inconveniente (51,87,91,97). La comparación entre el ILI y el IPI muestra que alrededor del 70% de los pacientes se incluye en el mismo grupo de riesgo con ambos índices si se considera el número de factores adversos (0-1, 2 o  $\geq 3$ ) (47,48) y que esta concordancia es mayor

en el grupo de bajo riesgo (48). Por otra parte, al incluir en la comparación pacientes con LF de grado III, se demuestra que el ILI es mejor para discriminar pacientes con LF de grado I o II, mientras que el pronóstico de los pacientes con LF de grado III queda mejor definido según el IPI (98).

Recientemente se ha diseñado un nuevo índice específico para los pacientes con LF (96). Las variables incluidas en el *Follicular Lymphoma International Prognostic Index* (FLIPI) son la edad, el estadio, el nivel sérico de LDH, la hemoglobina y el número de áreas ganglionares afectas. Dichas variables permiten clasificar a los pacientes en 3 grupos de pronóstico bueno, intermedio o malo según tengan 0-1, 2 o  $\geq 3$  factores adversos. Estos 3 grupos están bien equilibrados en cuanto al porcentaje de pacientes incluido en cada uno (36, 37 y 27%, respectivamente) y presentan un pronóstico claramente diferenciado, con una supervivencia a los 10 años del 71, 51 y 35%, respectivamente [Figura 7].

Figura 7. Supervivencia global según el FLIPI (Solal-Céligny et al. (96)).



Todos los factores e índices pronósticos previamente descritos han sido analizados y definidos en el momento del diagnóstico. Por el contrario, las series que analizan las variables predictivas en la recaída o progresión son más escasas. En estos estudios se incluyen variables evolutivas no disponibles en el momento del diagnóstico tales como el número de líneas de tratamiento previas, el tipo de respuesta alcanzado, la duración de la misma y, en algunos casos, el tratamiento administrado con anterioridad. La cantidad de quimioterapia administrada es un importante factor pronóstico. Así, aunque la serie de Cabanillas et al. (88) no está centrada en pacientes en recaída, el pequeño porcentaje de pacientes que han recibido quimioterapia previa presenta un peor pronóstico que el resto. De forma parecida, el haber precisado más de una línea de tratamiento para alcanzar una primera respuesta se acompaña de una supervivencia desde la progresión acortada en la serie de Johnson et al. (65). Finalmente el número de fracasos, que refleja el número de líneas de tratamiento administradas, se muestra como un importante factor pronóstico en la recaída al incluir en el estudio no solo pacientes en primera progresión sino también pacientes en subsiguientes recaídas (99). La respuesta al tratamiento inicial aparece como un importante factor predictivo en diferentes estudios, de manera que los pacientes que obtienen una buena respuesta presentan una supervivencia más prolongada que el resto (89,94). Por otra parte, los pacientes que alcanzan una RC tienen una menor probabilidad de recaída que los que alcanzan una RP en la serie de Johnson et al. (65), aunque, una vez se ha producido la progresión, la RC previa no implica una supervivencia prolongada en este estudio ni en el de Spinolo et al. (99), a diferencia de lo que ocurre en la serie de Weisdorf et al. (100). Finalmente, la duración de la respuesta aparece en este último estudio como uno de los factores fundamentales para predecir la supervivencia tras la progresión, aunque este dato no se confirma en otras series (65,101).



### **1.5.2. Factores biológicos.**

Diversas características referentes a la histología del tumor se han asociado a un pronóstico adverso en los pacientes con LF. El subtipo histológico, definido por el porcentaje de centroblastos, es la principal de ellas. El LF se muestra como una enfermedad con un espectro continuo de presentaciones desde el punto de vista citológico, desde un extremo en el que prácticamente solo hay células pequeñas hasta el extremo contrario con una infiltración prácticamente absoluta por células grandes. El porcentaje de centroblastos influye en el pronóstico de los pacientes con LF, de manera que el comportamiento clínico del linfoma se asemeja más al de los linfomas agresivos de células grandes al aumentar la proporción de este tipo de células. Ello hace que se hayan descrito diferentes métodos para clasificar los LF en varios subtipos según el porcentaje de células grandes, lo que en ocasiones ha dificultado el estudio del valor pronóstico del subtipo histológico por la heterogeneidad en las definiciones utilizadas. En la última clasificación de la OMS se recomienda mantener 3 subtipos de LF utilizando los criterios de Mann y Berard, aunque se reconoce que es posible agrupar los pacientes con LF de grado I y II en un único grupo con un pronóstico diferente de los pacientes con LF de grado III (1). Así, se observan diferencias tanto en la supervivencia global como en la supervivencia libre de progresión entre los pacientes con LF de grado I o II y aquellos con LF de grado III (78). Estas diferencias, además, se mantienen aún empleando varios de los métodos descritos para subclasificar los LF. Por el contrario no se detectan diferencias significativas en el pronóstico de los pacientes con LF de grado I o II (50,87), aunque un reciente estudio aleatorizado demuestra que los pacientes con LF de grado II presentan un mejor pronóstico al recibir tratamiento poliquimioterápico tipo CHOP-bleomicina que con monoterapia, mientras que en los pacientes con LF de

grado I no se observan dichas diferencias (102). Otra de las características histológicas de los LF a la que se ha asociado un valor pronóstico es la presencia de áreas difusas, habitual en los LF. Ezdinli et al. demostraron en 1987 una supervivencia más prolongada entre los pacientes con LF y un patrón puramente nodular que entre los pacientes con una arquitectura nodular-difusa (103). No obstante, estos datos no se han confirmado en posteriores estudios (83,87).

La translocación t(14;18) es el marcador citogenético característico del LF presente en el 70-85% de los pacientes. El valor pronóstico de esta translocación así como del reordenamiento *BCL-2/IgH* resultante es controvertido, especialmente por lo que respecta al reordenamiento, puesto que su detección varía ampliamente según la técnica utilizada. La existencia de la translocación t(14;18) detectada por citogenética convencional no se asocia a una evolución diferente de la observada en pacientes sin t(14;18) (104,105). Por el contrario, se han descrito otras anomalías citogenéticas que implican un pronóstico peyorativo en los paciente con LF, tales como duplicaciones del cromosoma 2 (dup 2p), deleciones del 13 (del 13q), presencia de regiones de tinción homogénea o *double minutes* (7), alteraciones del cromosoma 17 (104,105), alteraciones en 6q (105,106) o la presencia de < 20% de metafases normales (104). Algunas de estas alteraciones cromosómicas se asocian a progresión histológica de la enfermedad. Así los pacientes con alteraciones del cromosoma 17 o de 6q23-26 presentan un mayor riesgo de transformación histológica que el resto de pacientes (105). Los resultados referentes al valor pronóstico del reordenamiento *BCL-2/IgH* cuando se analiza mediante técnicas diferentes de la citogenética son sumamente variables. La detección del reordenamiento de *BCL-2* por *Southern blot (SB)* o PCR se acompaña de una mayor tasa de RC (107), mayor SLP (107) y mayor SG (108) en algunas series, mientras que Yunis et al. hallan una ventaja pronóstica en cuanto a la tasa de RC y a la

SG en los pacientes en que no se detecta el reordenamiento (109). Por último, dicho reordenamiento no se acompaña de valor pronóstico para la RC, SLP o SG en diversas series (108,110,111) [Tabla 4]. La heterogeneidad de estos resultados es debida, entre otros factores como aspectos técnicos, a la variabilidad de pacientes incluidos, ya que mientras que en algunas series se incluyen básicamente pacientes con LF de bajo grado en otras hay un elevado porcentaje de LF de alto grado. Al analizar por separado estos dos grupos se demuestra que el valor pronóstico del reordenamiento de *BCL-2* se produce a expensas de un alargamiento de la SG en los pacientes con LF de bajo grado y reordenamiento del oncogén, mientras que en los pacientes con LF de alto grado la existencia del reordenamiento no presenta valor pronóstico (108).

Tabla 4. Valor pronóstico del reordenamiento *BCL-2/IgH*

<i>Serie</i>	<i>N</i>	<i>Técnica</i>	<i>Reordenamiento (%)</i>	<i>RC</i>	<i>SLP</i>	<i>SG</i>
Yunis, 1989 <sup>(109)</sup>	20	SB ( <i>MBR, mcr, 5'</i> )	65	↑ en <i>BCL-2-</i>	NA	↑ en <i>BCL-2-</i>
Pezella, 1992 <sup>(110)</sup>	70	SB ( <i>MBR, mcr, 5'</i> )/ PCR ( <i>MBR, mcr</i> )	69	NA	NA	=
Johnson, 1995 <sup>(108)</sup>	102	PCR ( <i>MBR, mcr</i> )/ CG	41	=	=	↑ en <i>BCL-2+</i>
Bertoni, 1997 <sup>(111)</sup>	59	PCR ( <i>MBR</i> )	59	NA	=	=
López-Guillermo, 1999 <sup>(107)</sup>	247	PCR ( <i>MBR, mcr</i> )	82	↑ en <i>BCL-2+</i>	↑ en <i>BCL-2+</i>	NA

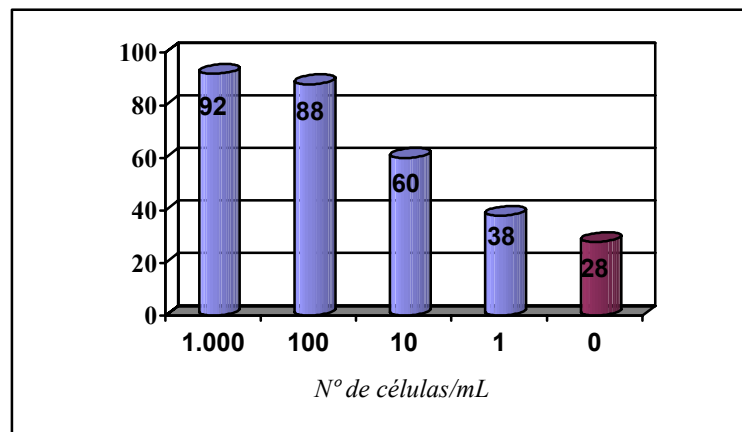
SB: *Southern Blot*; CG: citogenética; NA: no analizado.

Menos estudiado ha sido el posible efecto del punto de ruptura en el cromosoma 18 en el pronóstico de los pacientes con LF. López-Guillermo et al. demostraron que los pacientes con el punto de ruptura en *mcr* presentan unas características clínicas menos agresivas que los pacientes *MBR+* o que aquellos sin reordenamiento. Ello se traduce en una mayor tasa de RC y en una tendencia a presentar una SLP más prolongada en los pacientes *mcr+* que en el resto de pacientes (107).

La sencillez del estudio inmunohistoquímico para detectar la consecuencia del reordenamiento *BCL-2/IgH*, esto es, la sobreexpresión de BCL-2, ha llevado al análisis del valor pronóstico de la expresión proteica como sustituto del estudio del reordenamiento. Sin embargo, no existe una correlación directa entre reordenamiento y expresión de BCL-2. En realidad, los pacientes en que no se encuentra t(14;18) con frecuencia también sobreexpresan BCL-2. A diferencia de lo que ocurre con el linfoma difuso de células grandes en que la sobreexpresión de BCL-2 implica un mal pronóstico (112-115), en los pacientes con LF no se observan diferencias estadísticamente significativas en la SG según la expresión de BCL-2 (110). Cabe destacar que en los pacientes con LDCG la sobreexpresión de BCL-2 se asocia a características clínicas típicas de los pacientes con linfoma indolente, como una elevada proporción de pacientes en estadio avanzado (112) o una mayor frecuencia de infiltración medular (114), y que el mal pronóstico viene dado básicamente por una mayor tendencia a recaer (112-115). Por otra parte, en el subgrupo de pacientes con LF grado III, cuyas características y comportamiento clínico se asemejan más a las de los linfomas agresivos que a las de los linfomas indolentes, la sobreexpresión de BCL-2 se acompaña de un pronóstico adverso en cuanto a la SLP (81).

La persistencia de enfermedad residual no detectable clínicamente mediante estudios rutinarios se considera responsable de las recaídas en pacientes con LF en

respuesta clínica tras el tratamiento, de lo que se deriva la importancia del estudio de la enfermedad mínima residual (EMR) como factor predictivo de recaída. La demostración de que la persistencia de EMR se asocia a un mayor riesgo de recaída permitiría, por una parte, identificar pacientes de alto riesgo que pudieran ser candidatos a recibir tratamientos de intensificación de la respuesta y, por otra parte, podría servir para valorar la eficacia de nuevas modalidades terapéuticas, como equivalente de la recaída sin tener que esperar a la misma, lo que sería de gran utilidad en una enfermedad de larga evolución como el LF. La sensibilidad de la PCR, capaz de detectar una célula con el reordenamiento *BCL-2/IgH* entre  $1 \times 10^5$ - $10^6$  células sin el mismo, se ha mostrado como una herramienta fundamental para el estudio de la EMR en LF (116,117). Sin embargo, el papel pronóstico de la persistencia de EMR como predictor de recaída no está completamente aclarado, ya que los resultados publicados son, con frecuencia, contradictorios. Una de las principales causas de estas discrepancias es la variabilidad en la sensibilidad de las diferentes técnicas de PCR empleadas, como se demuestra en el estudio de Johnson et al. en el que 20 laboratorios internacionales analizan la misma muestra con diferentes concentraciones de células portadoras del reordenamiento *BCL-2/IgH*, obteniéndose resultados que varían considerablemente (118) [Figura 8].

Figura 8. Detección de *BCL-2/IgH* por PCR (adaptada de Johnson et al. (118))

Porcentajes de muestras con reordenamiento detectable según la cantidad de células *BCL-2/IgH* positivas.

Por otra parte, la existencia de individuos sanos portadores del reordenamiento *BCL-2/IgH* (31,34) constituye otro punto débil para la aplicación de la PCR como técnica de estudio de la EMR y obliga a descartar la existencia de una clona no maligna adicional portadora de la translocación, mediante la secuenciación del reordenamiento clonal y la comparación con la secuencia del reordenamiento en el momento del diagnóstico (119). Otra manera de obviar este problema consiste en el uso de PCR clono-específicas, pero esta aproximación es poco práctica para su aplicación rutinaria. Además de las dificultades relacionadas con aspectos técnicos, la interpretación del valor de la persistencia de EMR ofrece problemas añadidos. La demostración de que los pacientes que alcanzan una respuesta molecular tras el tratamiento, ya sea quimioterapia convencional (120), Rituximab (121) o trasplante de progenitores hemopoyéticos (TPH) (122-124), presentan una menor tendencia a la recaída, se ve contrarrestada por la evidencia de la existencia de pacientes con una RC prolongada pese a la persistencia del reordenamiento *BCL-2/IgH* (125,126). Así mismo es posible detectar el reordenamiento en sangre periférica en un porcentaje considerable de pacientes diagnosticados en estadio I o II y que se mantienen en respuesta tras el tratamiento (127,128). Por otra

parte, no existe una correlación absoluta entre la respuesta clínica y la molecular, de manera que no es inusual la ausencia de reordenamiento en pacientes con enfermedad detectable clínicamente (120,121,129). Así pues, aunque el alcanzar una respuesta molecular parece un objetivo deseable, la presencia del reordenamiento *BCL-2/IgH* tras el tratamiento no permite, por el momento, la toma de decisiones terapéuticas, puesto que no se ha demostrado que se asocie invariablemente a la recaída clínica. En la actualidad se está explorando el uso de la PCR en tiempo real (*real-time PCR*) para el estudio de la EMR. Esta técnica permite la cuantificación del reordenamiento y teóricamente es más reproducible que la PCR convencional (130). Se han publicado estudios que demuestran que el número de células circulantes con reordenamiento *BCL-2/IgH* es mayor en individuos con LF que en individuos sanos, aunque en éstos se puede detectar el reordenamiento en casi el 50% de ellos (131). Por otra parte diversos estudios sugieren que la persistencia de células *BCL-2/IgH* tras el trasplante autólogo no se asocia a recaída clínica si la carga tumoral se mantiene estable a niveles bajos (132,133). Aunque estos trabajos son interesantes ya que apoyan el valor pronóstico de la EMR a pesar de la existencia de individuos sanos con la translocación y de pacientes en respuesta prolongada con persistencia del reordenamiento, es necesaria la estandarización de la técnica y la determinación de un valor de corte para confirmar el valor pronóstico de la EMR y que se pueda utilizar para la toma de decisiones en la práctica clínica.

### ***1.6. Tratamiento.***

En el momento actual no existe un único tratamiento que se pueda considerar el estándar para los pacientes con LF, sino que, por el contrario, el abanico de opciones



terapéuticas es muy amplio, desde una actitud conservadora de observación sin tratamiento hasta el uso de terapias más intensivas incluyendo el trasplante alogénico de precursores hemopoyéticos. Ello es así debido a que ninguna opción terapéutica se ha mostrado superior al resto en cuanto a las posibilidades de larga supervivencia, de manera que cada una de las diversas armas terapéuticas existentes puede ser válida en unas circunstancias determinadas o en diferentes momentos de la evolución del LF.

### ***1.6.1. Opciones terapéuticas.***

#### ***Abstención terapéutica***

En 1984 Horning et al. demostraron que el hecho de diferir el inicio del tratamiento en pacientes asintomáticos con un linfoma indolente no empeoraba su pronóstico en cuanto a la supervivencia ni en cuanto al riesgo de transformación histológica. Así mismo, pese a que la mayoría de pacientes (61%) acabó requiriendo tratamiento, la mediana de tiempo hasta el inicio del mismo fue de 3 años y en gran parte de los pacientes el motivo para iniciarlo fue un crecimiento lento aunque progresivo de las adenopatías (44). Posteriores estudios han confirmado que esta estrategia es factible (134-136) y que está indicada especialmente en aquellos pacientes con unas bajas probabilidades de curación, es decir en estadios no localizados, que por su edad o comorbilidad son más susceptibles de padecer efectos indeseables derivados del tratamiento y que presentan escasa sintomatología relacionada con el linfoma. El principal inconveniente de esta actitud es la intranquilidad que puede causar en médico y paciente el hecho de saber que no se está tratando una enfermedad neoplásica, lo que puede llevar al inicio del tratamiento de forma precoz. En este sentido, en el estudio aleatorizado del grupo *GELA* comparando abstención frente a prednimustina o a interferon, un tercio de los pacientes en observación recibieron tratamiento

quimioterápico sin haber cumplido los criterios de progresión definidos en el protocolo (135).

### Radioterapia (RT)

La principal indicación de la RT como arma terapéutica en el LF radica en el tratamiento de estadios localizados, en los que esta modalidad terapéutica, acompañada o no de quimioterapia, permite la curación de un porcentaje significativo de pacientes. Se han ensayado diversas modalidades de RT con este objetivo: desde RT localizada a irradiación nodal total. El empleo de RT localizada, ya sea únicamente sobre el área ganglionar afecta (*involved field –IT-*) o extendida a la región ganglionar vecina no afecta (*extended field –ET-*), se acompaña de una SG a los 10 años de más del 60%. Sin embargo, únicamente un tercio de los pacientes permanece libre de recaída a los 10 años (137) y en la mayoría de los casos la recaída se produce en áreas no irradiadas (138,139). Por este motivo, se ha intentado mejorar estos resultados mediante el uso de campos de irradiación más extensos o de quimioterapia combinada. La irradiación nodal total (INT) o subtotal (INS) se asocia a una disminución en la tasa de recaídas en comparación con la RT localizada con una supervivencia libre de recaída del 67% a los 10 años, sin embargo esto no se traduce en una mejoría de la supervivencia, probablemente por una mayor mortalidad no relacionada con el linfoma en los pacientes que reciben INT o INS (137). La adición de quimioterapia a la RT produce resultados superiores a los obtenidos con RT localizada en un estudio no controlado (140), mientras que en diversos estudios aleatorizados no se han hallado diferencias entre la RT aislada y la combinación de RT con diferentes esquemas de quimioterapia (138). Por otra parte, la aparición de segundas neoplasias en pacientes que han recibido RT no localizada (137) o radio-quimioterapia (140) es motivo de preocupación. Así pues, el

papel de la combinación de radio y quimioterapia en LF en estadios localizados no está completamente aclarado.

Otras indicaciones de la RT en el tratamiento del LF son, acompañadas o no de quimioterapia, en pacientes en estadio III con escasa masa tumoral, en los que se ha demostrado una supervivencia prolongada (138,141), y como terapia adyuvante o paliativa en los casos con masa voluminosa.

#### Monoterapia con agentes alquilantes

Se han empleado numerosos agentes alquilantes, ya sea solos o junto con corticoides, en el tratamiento de los linfomas indolentes. Los más habitualmente empleados son el clorambucilo, la prednimustina y la ciclofosfamida, aunque las dosis y esquemas terapéuticos empleados son sumamente variables [Tabla 5]. La tasa de RC con monoterapia con agentes alquilantes oscila entre el 13 y el 65%. Tal variabilidad es debida, entre otras causas, a diferencias en la duración del tratamiento y en el momento en que se efectúa el re-estadiaje, puesto que la mediana de tiempo hasta alcanzar la remisión completa es de 12 meses en algunas series (142). La mediana de supervivencia que se observa con monoterapia con agentes alquilantes es de alrededor de 8 años, aunque menos de un tercio de pacientes está libre de enfermedad a los 10 años (143). La principal ventaja de esta modalidad de tratamiento es la comodidad, puesto que se administra por vía oral y no requiere controles demasiado frecuentes, y la buena tolerancia. En este sentido, el efecto secundario más importante es la mielosupresión que producen y, a largo plazo, el potencial efecto leucemógeno. Por todo ello, está indicado básicamente en pacientes mayores en estadio avanzado, con escasa masa tumoral, en los que no hay una urgencia en conseguir una respuesta.

Tabla 5. Monoterapia con agentes alquilantes en linfomas indolentes.

<i>Autor</i>	<i>N</i>	<i>Quimioterapia</i>	<i>RC</i> (%)	<i>SG</i> ( <i>mediana</i> )
Kennedy <sup>(144)</sup>	13	CFM 150 mg/d	46	30m
Hoppe <sup>(142)</sup>	17	CFM 1,5-2,5 mg/kg/d CLB 0,1-0,2 mg/kg/d	64	>48m
Rosenberg <sup>(145)</sup>	37	CFM 1,5-2,5 mg/kg/d CLB 0,1-0,2 mg/kg/d	65	133m
Lister <sup>(146)</sup>	31	CLB 10 mg/d x 6 sem + 15 d/m x 5 m	13	NE
Portlock <sup>(147)</sup>	26	CLB 16 mg/m <sup>2</sup> x 5d/m	42	>60m
Cavallin-Stahl <sup>(148)</sup>	106	Prednimustina 150-200 mg x 5d/m	63	42m
Brice <sup>(135)</sup>	64	Prednismustina 200 mg/m <sup>2</sup> x 5d/m x 18m	56	>45m (5a: 70%)
Peterson <sup>(102)</sup>	119	CFM 100 mg/m <sup>2</sup> x 2 a	66	8,7 a

CFM: ciclofosfamida; CLB: clorambucilo; m: meses; NE: no especificado.

### Poliquimioterapia

Se han ensayado numerosos esquemas de poliquimioterapia como tratamiento de los pacientes con LF en un intento de mejorar la SLP obtenida con monoterapia. Entre los regímenes de poliquimioterapia sin adriamicina el más empleado es el esquema CVP o COP, que incluye ciclofosfamida, vincristina y prednisona. Con esta pauta u otras similares tales como COPP o BCVP, en las que se añade procarbazona o BCNU, la tasa de RC oscila entre el 40 y el 80%, dependiendo básicamente de la duración del tratamiento, la mediana de supervivencia se sitúa alrededor de los 6-8 años y la respuesta se mantiene 18-36 meses (143). La adición de fármacos antraciclínicos a estos regímenes no aporta, a diferencia de lo que ocurre con los linfomas agresivos (56,149), una mejoría significativa de los resultados obtenidos. Así, con el esquema CHOP (ciclofosfamida,

adriamicina, vincristina y prednisona) un 60% de los pacientes alcanza un RC, sin que ello se traduzca en una disminución en la tasa de recaídas ni en una mayor supervivencia (149,150). Finalmente se ha intentado el empleo de esquemas más intensivos habitualmente utilizados en el tratamiento de linfomas agresivos. Los resultados, una vez más, son similares a los obtenidos con tratamientos menos agresivos [Tabla 6].

Tabla 6. Poliquimioterapia en linfomas indolentes.

<i>Pauta</i>	<i>Fármacos</i>	<i>RC (%)</i>	<i>SG (mediana)</i>
COP <sup>(146)</sup>	CFM, VCR, PDN	37	NE
PACOP <sup>(150)</sup>	CFM, Adria, VCR, Proc	47	>53m
	PDN + mantenimiento		(62% a 5a)
CHOP <sup>(151)</sup>	CFM, Adria, VCR, PDN	64	6,9 a
ProMACE-MOPP <sup>(134)</sup>	PDN, MTX, Adria, CFM,	78	>60m
	VP-16, Mec, VCR, Proc		(75% a 5a)
ATT <sup>(152)</sup>	CHOD- Bleo/ESHAP/NOPP	87	>5,9 a

CFM: ciclofosfamida; VCR: vincristina; PDN: prednisona; Adria: adriamicina; Proc: procarbazona; MTX: metotrexate; VP-16: etopósido; Mec: mecloretamina; CHOD: ciclofosfamida, adriamicina, vincristina, dexametasona; Bleo: bleomicina; ESHAP: etopósido, citarabina, prednisona, cis-platino; NOPP: mitoxantrone, vincristina, prednisona, procarbazona; NE: no especificado.

### Análogos de las purinas

Los análogos de las purinas son fármacos anti-metabolito que actúan, entre otros mecanismos, inhibiendo la reparación del ADN. Los estudios iniciales con análogos de las purinas como monoterapia en linfomas indolentes, básicamente con 2CDA o fludarabina, muestran una tasa de respuestas de alrededor del 80-90%, aunque la proporción de RC no es superior a la obtenida con esquemas como COP o CHOP. La combinación de fludarabina con otros agentes quimioterápicos, avalada por la demostración *in vitro* de un efecto sinérgico entre ellos (153), ha permitido mejorar estos resultados. Así los esquemas FC (fludarabina y ciclofosfamida), FND (fludarabina, mitoxantrone y dexametasona) o FCM (fludarabina, ciclofosfamida y

mitoxantrone) permiten alcanzar una RC en casi el 90% de los pacientes (152,154,155). Incluso en pacientes tratados en recaída se observa que un porcentaje no despreciable alcanza una RC molecular, es decir la desaparición de toda evidencia molecular de enfermedad (156,157). Así pues, los resultados son prometedores, aunque el seguimiento de los pacientes tratados con estos esquemas es aún demasiado corto para saber si se van a traducir en una prolongación de la supervivencia. Por otra parte, además de la toxicidad a corto plazo, principalmente en forma de infecciones oportunistas que obliga al uso de antibióticos profilácticos, la toxicidad tardía, específicamente su efecto sobre la médula ósea, es objeto de preocupación. En este sentido, por un lado se ha asociado el uso de análogos de las purinas con la dificultad para la obtención de progenitores hemopoyéticos en pacientes candidatos a autotrasplante (158-160) y, por otro lado, se ha involucrado el tratamiento previo con análogos de las purinas en el desarrollo de síndromes mielodisplásicos (SMD) en pacientes sometidos a un trasplante autólogo de precursores hemopoyéticos (161).

### Inmunoterapia

En los últimos años se han añadido nuevas opciones terapéuticas al manejo de los pacientes con LF, muchas de las cuales presentan mecanismos de acción que difieren de los clásicos de la quimioterapia convencional. Entre éstas destacan el interferon, los anticuerpos monoclonales (AcMo) y, aún en fase experimental, las vacunas anti-idiotipo y otras.

Pese a que su mecanismo de acción no es del todo bien conocido, el interferon (IFN) se viene utilizando en el tratamiento de los linfomas indolentes desde hace años. Se han ensayado múltiples esquemas de administración: como monoterapia, en combinación con poliquimioterapia y como mantenimiento tras la respuesta. Como monoterapia el

IFN es capaz de inducir una RC en el 42% de pacientes con LF con baja masa tumoral, aunque la SG (84% a los 5 años) no muestra diferencias significativas con la alcanzada en pacientes sin tratamiento inicial o tratados con prednimustina (135). Los resultados obtenidos con la combinación de IFN y diferentes pautas de poliquimioterapia son muy heterogéneos, como variados son los regímenes con los que se ha combinado. La adición de IFN a la quimioterapia en la fase de inducción no mejora la tasa de respuesta en comparación con ciclofosfamida (162), COP (163), clorambucil (164) o CHOP (165), aunque en alguno de estos estudios prolonga la duración de la respuesta (163,165). No se observa una mejoría en la SLP cuando se administra como tratamiento de mantenimiento (166,167). La administración de IFN junto con quimioterapia de inducción alarga la SLP en las series de los grupos ECOG y GELF (165,168), aunque únicamente se demuestra una ventaja del IFN en cuanto a la supervivencia en el estudio francés (168). Dos recientes meta-análisis han puesto en evidencia que la eficacia de IFN se limita a aquellos estudios en que se combina con quimioterapias que incluyen adriamicina o de intensidad similar (169,170) o cuando se administran dosis altas de IFN(171)

El empleo de AcMo se basa en un planteamiento totalmente distinto: a diferencia de la búsqueda del efecto citotóxico o citostático indiscriminado de la mayoría de quimioterápicos, en este caso se trata de la síntesis de una inmunoglobulina dirigida contra una diana específica. Rituximab es un AcMo quimérico murino humanizado, dirigido contra el antígeno CD20, presente en la superficie de la mayoría de los linfocitos B. Este antígeno constituye una diana perfecta ya que no circula libremente, no se internaliza, ni se libera al medio extracelular tras unirse al anticuerpo anti-CD20 (172). Por otra parte, el hecho de que se exprese en los linfocitos B pero no en otras células hemopoyéticas hace que rituximab sea altamente selectivo y evita la

mielosupresión característica de los tratamientos con quimioterapia convencional. Así, los efectos indeseables de este fármaco se limitan habitualmente a cuadros pseudo-gripales relacionados con la infusión (173). El mecanismo de acción de rituximab no es del todo bien conocido, pero es seguro que participan, entre otros, mecanismos de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos y mecanismos de citotoxicidad dependiente del complemento. En cuanto a su efectividad terapéutica en el tratamiento de linfomas indolentes, si bien los resultados obtenidos como monoterapia son modestos, con tasas de respuesta de alrededor del 60% en pacientes en recaída (173-176) y alrededor del 75% como tratamiento de primera línea (177,178), la combinación con la quimioterapia convencional ofrece resultados prometedores. La combinación de rituximab con otros agentes, favorecida por el hecho de que sus toxicidades no se solapan, se basa principalmente en su diferente mecanismo de acción. En este sentido, diversos estudios *in vitro* han demostrado que rituximab potencia la citotoxicidad de fludarabina (179,180), mitoxantrone (181) y otros citostáticos (182). Así mismo, varios estudios avalan la eficacia clínica de la combinación de rituximab con fludarabina (64), CHOP (183,184), FM (184) o FCM (185), mostrando tasas de respuesta que oscilan entre el 92% y el 100% (incluyendo la RC en 40-80% y la respuesta molecular en alrededor del 90%) en pacientes con LNH indolente. Por otra parte, los AcMo pueden utilizarse para vehicular radioisótopos, constituyendo la base de la radioinmunoterapia. Esta modalidad terapéutica, cuyos principales representantes son Ytrio<sup>90</sup> ibritumomab tiuxetan (Zevalin®) y Iodo131 tositumomab (Bexxar®), se basa en la unión de un AcMo anti-CD20 a una partícula radioactiva. De esta manera se consigue extender el efecto tóxico no sólo a los linfocitos a los que se une el AcMo sino también a las células tumorales vecinas. Debido a su mecanismo de acción son más mielotóxicos que rituximab e incluso se ha descrito el desarrollo de SMD tras su administración



(176,186) aunque en pacientes con múltiples líneas de tratamiento previas. Por lo que hace referencia a su efectividad, en un estudio randomizado se ha demostrado la superioridad de Zevalin® frente a rituximab, básicamente en cuanto a la tasa de respuesta; sin embargo estas diferencias son moderadas y no se traducen en una prolongación de la SG o de la SLP (176).

Las vacunas anti-idiotipo también basan su efecto en el desencadenamiento de una respuesta inmunológica contra las células neoplásicas, pero su diseño es radicalmente diferente puesto que lo que se administra al paciente son proteínas tumorales obtenidas de la biopsia efectuada en el momento del diagnóstico. El hecho de que los linfomas B expresen en la membrana de las células tumorales una inmunoglobulina de superficie con determinantes antigénicos o idiotipos únicos para cada clona celular, permite la síntesis de vacunas específicas para cada tumor, que se sintetizan de forma individualizada en cada paciente (60). Los principales inconvenientes de esta aproximación terapéutica son, por una parte, su laboriosidad y, por otra parte, el hecho de que las vacunas sintetizadas al diagnóstico pueden no ser útiles en la recaída. Esto es debido a la existencia de hipermutaciones somáticas que provocan cambios en el idiotipo del tumor contra el que se había sintetizado la vacuna.

Otra aproximación terapéutica innovadora es la terapia *anti-sense* mediante el empleo de oligonucleótidos anti-sentido. Los oligonucleótidos anti-sentido son cadenas cortas de ADN con una secuencia complementaria a la del ARNm diana, capaz de inhibir la expresión génica. En los LF la sobreexpresión de BCL-2 derivada del reordenamiento *BCL-2/IgH* provoca una inhibición de la apoptosis, por lo que el oncogén *BCL-2* constituye una diana óptima para la terapia *anti-sense*. Los resultados publicados hasta el momento son básicamente estudios en fase I con datos prometedores pero prematuros. Un aspecto interesante que se está investigando es la posibilidad de

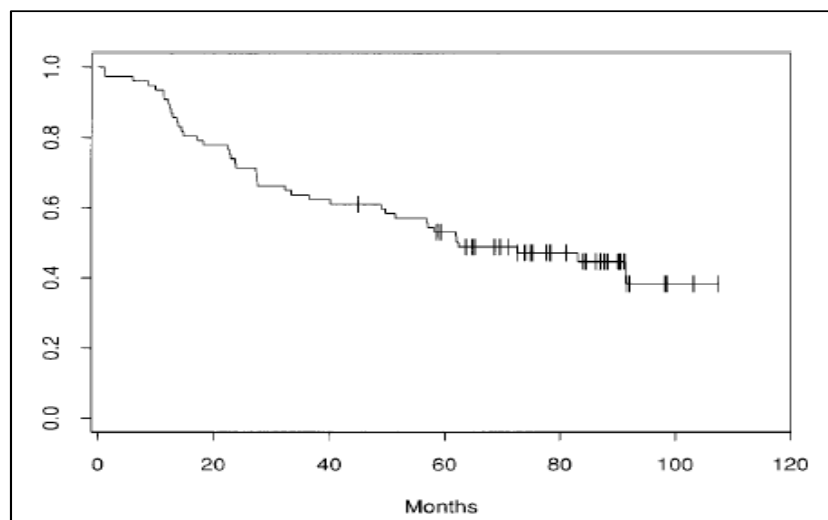
que al inhibir la expresión de BCL-2 se venza la quimioresistencia de las células linfomatosas, lo que aumentaría el efecto de la quimioterapia al utilizarlo en combinación (187).

### Trasplante de progenitores hemopoyéticos (TPH)

La administración de quimioterapia a altas dosis seguida de rescate con progenitores hemopoyéticos en sus distintas modalidades tiene un papel aún controvertido en el tratamiento de los pacientes con linfoma indolente, a diferencia de lo que ocurre en los linfomas agresivos, en los que esta aproximación terapéutica está aceptada como tratamiento de elección en la recaída. El trasplante autólogo de progenitores hemopoyéticos (autoTPH) se ha utilizado como consolidación de la quimioterapia convencional de primera línea en pacientes con LNH indolente con factores de riesgo. En esta situación se observan SLP prolongadas, alrededor del 70% a los 5 años (188-190), que muestran diferencias significativas al compararse con las obtenidas en controles históricos (189,191). Sin embargo, debe tenerse en cuenta que se trata de series altamente seleccionadas, no sólo en cuanto a la edad, sino también por el hecho de incluir básicamente a pacientes que han alcanzado una muy buena respuesta tras el tratamiento inicial, que, por otra parte, suele ser más intensivo que el utilizado habitualmente. No obstante, pese a los buenos resultados obtenidos con el trasplante en primera línea y dada la naturaleza indolente del LF, estos procedimientos habitualmente se reservan para el tratamiento de pacientes en recaída. La escasa toxicidad precoz del autoTPH ha extendido su uso en esta indicación, de modo que las series publicadas son numerosas. Los pacientes incluidos en estos estudios son muy heterogéneos, incluso dentro de una misma serie, especialmente en cuanto a la fase de la enfermedad en que se hallan, lo que, en ocasiones, dificulta su análisis. Otro aspecto a tener en cuenta en la

valoración de los resultados de estas series es el hecho de que, por la propia naturaleza del procedimiento, los pacientes incluidos son seleccionados, fundamentalmente por lo que hace referencia a la edad. Aún así, los resultados que se pueden extrapolar de los estudios publicados indican que este procedimiento es capaz de proporcionar una SLP de alrededor del 50-60% y una SG del 60 al 80% a los 4 años (124,192-194) [Figura 9].

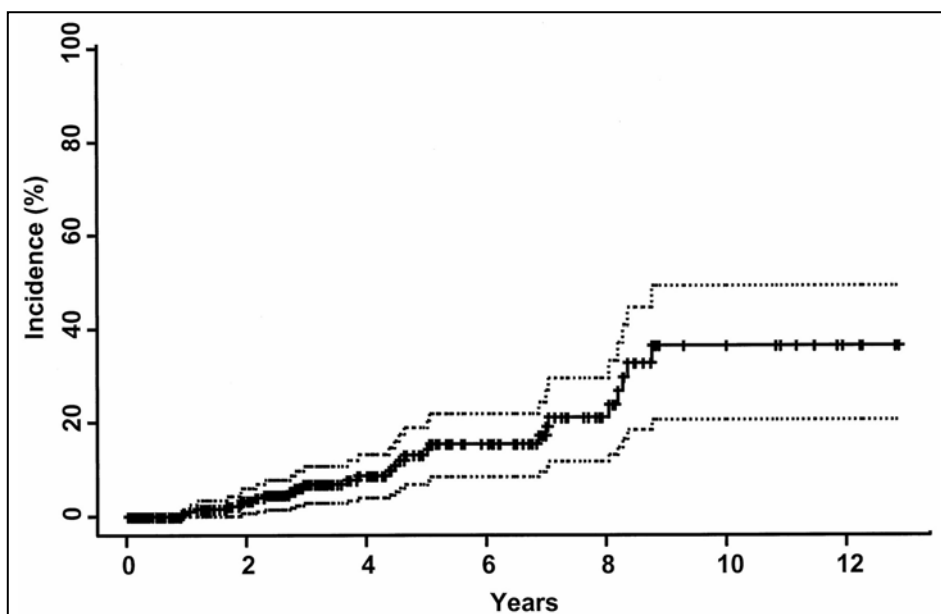
Figura 9. Supervivencia libre de progresión tras el trasplante en 153 pacientes con LF (Freedman et al. (193)).



La comparación con controles históricos muestra una prolongación de la SLP en 2 series (124,194), aunque ello se traduce en una mejoría de la SG únicamente en una (194). Un reciente estudio aleatorizado demuestra la superioridad del trasplante autólogo frente a quimioterapia convencional como tratamiento de rescate en pacientes con LF en recaída tanto en cuanto a la SLP como en cuanto a la SG (195). En algunos de los estudios que incluyen pacientes en transformación histológica, éstos presentan un pronóstico algo peor que el resto (196), sin embargo, y pese a que las series de pacientes trasplantados en transformación son cortas, parece que los pacientes en transformación

histológica, especialmente aquellos que se muestran quimiosensibles y alcanzan una RC tras el tratamiento de rescate, pueden alcanzar supervivencias más prolongadas tras el TPH que tras la quimioterapia convencional (75,76,197,198). Estos buenos resultados del autoTPH se obtienen con una toxicidad precoz similar a la observada con quimioterapia convencional, puesto que la mortalidad relacionada con el trasplante (MRT) es del 5-10% en la mayoría de series (192,194,196). Por el contrario, la toxicidad tardía observada es preocupante, dado que se ha descrito la aparición de SMD secundarios en un porcentaje que oscila entre el 2% y el 12% (192-194,199), con una probabilidad actuarial del 14% a los 5 años (161) (Figura 10). Esta probabilidad es superior a la observada en pacientes con linfomas indolentes que han recibido varias líneas de quimioterapia, incluyendo alquilantes, pero que no han sido sometidos a un TPH (65,89). El riesgo de SMD tras el trasplante es menor en pacientes con linfoma agresivo que en pacientes con linfoma indolente, aunque también se ha descrito su aparición en pacientes trasplantados en transformación histológica (76,197).

Figura 10. Probabilidad actuarial de SMD (Micallef et al. (161)).

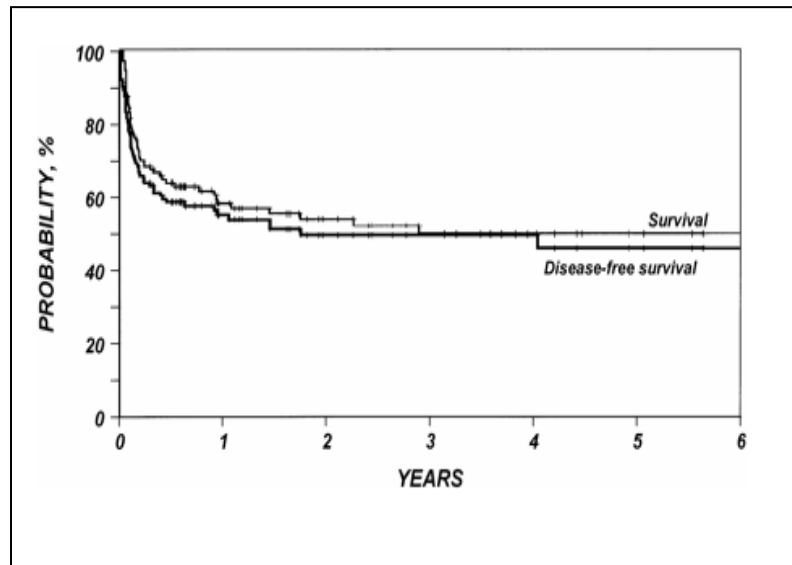


Se han implicado diversos factores en el desarrollo de SMD en pacientes auto-trasplantados, tales como la edad (161), la RT previa al TPH (200,201), el uso de agentes alquilantes (202), la administración de fludarabina (161,203) o el acondicionamiento con irradiación corporal total (203). Ello ha dado lugar a diversas estrategias para evitar la aparición de esta complicación de pronóstico infausto (200) tales como evitar la radioterapia en el acondicionamiento (161), descartar el trasplante en pacientes con anomalías citogenéticas previas al mismo (161), o, incluso, preconizar el trasplante en fases más precoces. Precisamente el momento más adecuado para llevar a cabo este procedimiento es uno de los puntos más controvertidos, ya que también se ha descrito el desarrollo de SMD en pacientes trasplantados en primera línea (189), por lo que, si bien parece aceptarse la superioridad del autoTPH frente a la quimioterapia convencional para prolongar la duración de la respuesta, ello se puede producir a costa de una toxicidad inaceptable en un grupo de pacientes con una enfermedad, por otra parte, indolente.

El trasplante alogénico de progenitores hemopoyéticos (aloTPH) tiene un papel más limitado en el tratamiento del LF por las restricciones obvias de la edad y de la disponibilidad de donante. De todos modos, se han publicado varias series, principalmente a partir de datos de registros. En general, el aloTPH se acompaña de una SLP prolongada (50-78% a los 3 años), con una SG prácticamente idéntica a la supervivencia libre de progresión (50-78% a los 3 años) (204-206) [Figura 11]. Este comportamiento difiere completamente del observado en la historia natural de los linfomas indolentes, en que a lo largo del seguimiento siempre se halla una proporción de pacientes que sobreviven pese a la persistencia de la enfermedad. Ello es así debido a la elevada mortalidad asociada al procedimiento (MRT: 20-40%) (204-206), aunque

ésta parece estar disminuyendo en las series más recientes, probablemente debido a una mejor selección de los enfermos.

Figura 11. SG y supervivencia libre de enfermedad en 113 pacientes sometidos a aloTPH (Van Besien et al. (205)).



Los datos de Verdonck et al., Stein et al. y del IBMTR (*International Bone Marrow Transplant Registry*) comparando el trasplante autólogo con el alogénico en pacientes con linfoma indolente muestran una superioridad del aloTPH en cuanto a la SLP, excepto en la serie de Stein et al., sin que ello se traduzca en una prolongación de la supervivencia, debido a la elevada mortalidad del aloTPH (199,204,207) [Tabla 7]. En la valoración de estos resultados se ha de tener en cuenta las importantes diferencias en las características de los pacientes de cada grupo, puesto que los pacientes sometidos a una aloTPH son por lo general más jóvenes pero menos quimiosensibles que los sometidos a autoTPH. De forma anecdótica, se han realizado trasplantes alogénicos de donante no emparentado (206).

Tabla 7. TPH autólogo frente a TPH alogénico en linfomas indolentes.

<i>Autor</i>	<i>N</i>	<i>Edad</i> ( <i>mediana</i> )	<i>SLP</i>	<i>MRT</i>	<i>SG</i>
Verdonck et al <sup>(204)</sup>					
(aloTPH)	10	43	68* <i>p</i> =0,04	30	70* <i>p</i> =NS
(autoTPH)	18	47	22*	0	33*
Stein et al <sup>(199)</sup>					
(aloTPH)	15	43	64# <i>p</i> =0,04	53	15# <i>p</i> =0,01
(autoTPH)	36	48	71#	14	56#
Van Besien et al. <sup>(207)</sup>					
(aloTPH)	176	42	45# <i>p</i> <0,001	30#	51# <i>p</i> =NS
(autoTPHp)	131	49	39#	14#	62#
(autoTPH)	597	49	31#	8#	55#

\*: 2 años; #: 5 años; NS: no significativo; autoTPHp: autoTPH con purgado.

La toxicidad del aloTPH limita su empleo en pacientes con LF, muchos de los cuales no son candidatos a estos procedimientos por su edad avanzada o por haber recibido previamente múltiples tratamientos. Con el objeto de disminuir la MRT y, de esta manera, mejorar el pronóstico de los pacientes que son sometidos a un aloTPH, por una parte, y extender el empleo del aloTPH a pacientes no candidatos a un trasplante convencional, por otra, se ha ensayado el uso de aloTPH con acondicionamientos de intensidad reducida o no mieloablativos. Esta modalidad de trasplante se fundamenta en el mecanismo inmunosupresor del aloTPH, de manera que lo que se persigue es provocar un efecto del injerto contra el linfoma más que el efecto citorreductor del acondicionamiento. La respuesta del linfoma al retirar la inmunosupresión o infundir linfocitos del donante, coincidiendo con el desarrollo de una enfermedad del injerto contra el huésped, en pacientes que no alcanzan una RC o que progresan tras el trasplante demuestra la existencia de este efecto en pacientes con LF y otros tipos de LNH (208-212). Las series publicadas hasta el momento son cortas y con escaso

seguimiento, pero prometedoras en cuanto a la toxicidad y a la respuesta tanto clínica como molecular.

### ***1.6.2. Tratamiento de primera línea.***

Las modalidades de tratamiento existentes son, pues, muy variadas, sin que ninguna de ellas destaque sobre las demás en cuanto a las posibilidades reales de curación en un porcentaje significativo de pacientes. Ello hace que no se pueda hablar de un tratamiento de elección en el LF, sino que, por el contrario, una o varias aproximaciones terapéuticas pueden ser de utilidad en unas circunstancias determinadas. La excepción la constituyen los pacientes diagnosticados en estadios localizados, en los que sí hay consenso al considerar la RT, acompañada o no de quimioterapia, como el tratamiento de elección. En los pacientes diagnosticados en estadio avanzado, esto es, la mayoría de pacientes con LF, hay que tener en cuenta otros aspectos a la hora de decidir el tratamiento a administrar. Así, en pacientes asintomáticos al diagnóstico, o con escasa masa tumoral que no requiere una rápida reducción, la abstención terapéutica o el empleo de agentes alquilantes pueden ser buenas opciones terapéuticas. En pacientes jóvenes el riesgo leucemógeno de los alquilantes, por una parte, y la posibilidad de alcanzar una RC molecular, con la potencial ventaja pronóstica que esto supone, con nuevos tratamientos tales como los análogos de las purinas o los AcMo, por otra parte, desaconsejan el empleo de dichas opciones, que suelen reservarse en general para pacientes mayores. Por el contrario, en pacientes sintomáticos o con gran masa tumoral la poliquimioterapia es capaz de proporcionar una respuesta más rápida que la que se obtiene con monoterapia. La elección de uno u otro esquema de poliquimioterapia



depende de factores tales como los hábitos de cada centro, las preferencias de los pacientes y la posibilidad de participar en ensayos clínicos, entre otros.

### ***1.6.3. Tratamiento de rescate.***

Contrariamente a lo que cabría esperar, el panorama en relación con el tratamiento de rescate no difiere sustancialmente del observado en la elección del tratamiento de primera línea. Las opciones disponibles así como los criterios de elección son básicamente los mismos que en los pacientes sin tratamiento previo, con la salvedad del papel que puede jugar el TPH en esta situación. Es indudable que el tratamiento administrado como primera línea tiene una influencia primordial en la elección del tratamiento de rescate. En primer lugar, al eliminar una opción terapéutica en la mayoría de los casos, ya que obliga al empleo de fármacos diferentes de aquellos a los que el tumor se ha vuelto resistente. Se han ensayado en este sentido diversos esquemas de quimioterapia con combinaciones de ifosfamida, VP-16 y citarabina que permiten obtener un porcentaje considerable de respuestas (213,214). Una excepción a esta norma es el uso de AcMo, ya que se ha publicado la existencia de segundas respuestas en pacientes tratados previamente con rituximab (215,216). En segundo lugar, el tratamiento de primera línea puede condicionar las posibilidades de éxito y la toxicidad del tratamiento de rescate: así, se ha asociado la administración de fludarabina con el fracaso en la movilización para la obtención de precursores hemopoyéticos de sangre periférica (158-160) y con el diagnóstico de SMD en pacientes sometidos a un TPH (161). Todo ello obliga a plantear el tratamiento en el momento del diagnóstico teniendo en cuenta las posibilidades ante una eventual, y más que probable, recaída. Una situación particular se produce con la transformación histológica en la recaída.

Prácticamente ésta es la única circunstancia en la que existe consenso acerca de la actitud a seguir: el mal pronóstico de los pacientes con una transformación a un LNH de alto grado obliga a tratarlo como tal y a administrar una quimioterapia intensiva propia de un LNH agresivo seguida o no de TPH.

Por lo que hace referencia al TPH, su potencial efecto prolongando la duración de la respuesta con una toxicidad precoz aceptable hace de ésta una atractiva opción, siempre y cuando sea posible la reducción de la toxicidad tardía. Debido al riesgo de SMD post-trasplante en esta población, además de evitar aquellos factores que pueden aumentarlo, la estricta selección de los pacientes que, por su mal pronóstico merecen correr el riesgo de un tratamiento agresivo, es crítica. Para ello es básico el conocimiento de los factores pronósticos que influyen en la supervivencia tras la recaída. Evidentemente, este punto cobra una importancia extrema en el caso del aloTPH. Es de prever que la práctica y el perfeccionamiento en el manejo de los aloTPH con acondicionamiento de intensidad reducida extiendan su uso, lo que acrecienta la necesidad de unas indicaciones claras respecto a los pacientes que se pueden beneficiar de estos procedimientos.

## ***II. HIPÓTESIS***

Los LF continúan siendo enfermedades incurables. En los últimos 20 años se han llevado a cabo múltiples intentos para modificar la historia natural de los pacientes con LF sin que se haya observado una mejoría sustancial en el pronóstico de estos pacientes. Las distintas opciones terapéuticas empleadas, desde las más clásicas -monoterapia con agentes alquilantes, poliquimioterapia con o sin antraciclínicos- a las más innovadoras -interferón, análogos de las purinas, o AcMo- se han acompañado de un éxito relativo en cuanto a la posibilidad de alcanzar una respuesta y en cuanto a su duración. Sin embargo, ninguna de ellas ha demostrado un aumento en la supervivencia. El trasplante autólogo de precursores hemopoyéticos parece acompañarse en algunas series de una prolongación sostenida de la supervivencia libre de enfermedad en un grupo de pacientes, aunque dicho procedimiento no cura la enfermedad. Por el contrario, el trasplante alogénico de medula ósea parece curar a una fracción de pacientes lo que se relaciona con el efecto del injerto contra el tumor y abre interesantes posibilidades a la terapia celular en este tipo de tumores. Sin embargo, la mortalidad asociada con el trasplante alogénico y la edad avanzada de la mayoría de enfermos con LF hacen que este procedimiento no pueda ser empleado de forma sistemática. Los resultados comunicados hasta la fecha con trasplantes con regímenes de acondicionamiento no mieloablativos son prometedores pero sus efectos a largo plazo se desconocen, por lo que se consideran un procedimiento experimental. Nos hallamos, pues, con tratamientos potencialmente curativos que, sin embargo, se acompañan de una toxicidad considerable. Es por ello que dichos procedimientos habitualmente se reservan para pacientes en fases avanzadas de su enfermedad en los que las posibilidades de una buena respuesta son escasas. En este contexto, es indispensable la adecuada selección de aquellos pacientes en que el mal pronóstico de su LF contrarresta el posible efecto negativo de la toxicidad del procedimiento. Es imprescindible, pues, el conocimiento de

las características adversas del linfoma que determinan un acortamiento de la supervivencia, con el fin de identificar los pacientes que merecen el riesgo de ser sometidos a un procedimiento agresivo. En este sentido, se han señalado una serie de variables que condicionan el pronóstico de los pacientes con LF en el momento del diagnóstico y que permiten reconocer a los pacientes de riesgo. La importancia del estudio de dichas variables radica en el hecho de que, aunque en la mayoría de los pacientes el LF tiene un curso clínico poco agresivo, en ocasiones es rápidamente evolutivo, de ahí la importancia de identificar a dichos pacientes. Por otra parte, la naturaleza generalmente indolente del LF junto con la potencial toxicidad del TPH hacen que habitualmente se reserve esta opción para pacientes en recaída, de lo que se deriva la necesidad de identificar las variables que implican un pronóstico adverso de los pacientes también en el momento de la progresión. La mayoría de estudios que han analizado los factores pronósticos para la supervivencia desde la progresión se han centrado en variables como el tipo de respuesta inicial o la duración de la misma, más que en las características que presenta el linfoma en el momento de la recaída. Es posible que la calidad y duración de la respuesta vengan influidos por el tratamiento de primera línea administrado, mientras que las características inherentes del LF en la recaída probablemente reflejen de forma más fidedigna la agresividad intrínseca de éste. En este contexto, el reconocimiento de las características adversas del tumor en el momento de la recaída puede ser de utilidad para identificar a los pacientes con un pronóstico infausto que los haría candidatos a someterse a procedimientos intensivos.

En definitiva, la identificación de las características clínicas o biológicas en el momento del diagnóstico que se asocian con una evolución clínica más agresiva así como el reconocimiento de los factores en la recaída -sean relacionados con la respuesta al tratamiento o con la naturaleza del tumor- que se acompañan de una supervivencia

acortada, permitiría la selección de los pacientes candidatos a recibir tratamientos experimentales.

### ***III. OBJETIVOS***

### **3.1. Objetivo general.**

Estudiar la historia natural, así como los factores pronósticos tanto al diagnóstico como en la recaída, de los pacientes con linfoma folicular.

### **3.2. Objetivos concretos.**

1. Analizar la correlación existente entre la presencia del reordenamiento *BCL-2/IgH* en pacientes con LF y las características clínicas al diagnóstico, así como su valor pronóstico.
2. Estudiar el valor predictivo de la duración de la respuesta y de otras variables en la recaída para la supervivencia desde la progresión.
3. Analizar el valor pronóstico del *Follicular Lymphoma International Prognostic Index* (FLIPI) para la supervivencia desde la progresión.



## ***IV. RESULTADOS***

#### ***4.1. Incidencia y significado clínico del reordenamiento BCL-2/IgH en el linfoma folicular.***

##### ***4.1.1. Resumen.***

El LF se caracteriza desde un punto de vista molecular por el hallazgo del reordenamiento *BCL-2/IgH*, que se detecta en el 70% de los casos en el momento del diagnóstico. El significado clínico de la presencia del reordenamiento es objeto de controversia, por lo que el objetivo de este estudio fue analizar la existencia de este reordenamiento en pacientes con LF mediante una técnica de PCR y correlacionar los hallazgos moleculares con las características clínicas y con el pronóstico. Se incluyeron en el estudio 69 pacientes (35 hombres/34 mujeres con una mediana de edad de 53 años) diagnosticados de LF en un único centro. Se analizaron 77 muestras de ADN, 54 de ellas obtenidas de la biopsia ganglionar y 23 de sangre periférica o médula ósea. El reordenamiento *BCL-2/IgH* se estudió en los puntos de ruptura *MBR* y *mcr* mediante una técnica de PCR. Se detectó el reordenamiento *BCL-2/IgH* en el punto de ruptura *MBR* en 39 pacientes de 60 con una muestra valorable (65%), mientras que se detectó el reordenamiento en *mcr* en un paciente (2%) y en 20 pacientes (33%) no se detectó el reordenamiento en ninguno de los 2 puntos de ruptura analizados. En relación con las características iniciales, los pacientes con el reordenamiento *BCL-2/IgH* en *MBR* o *mcr* eran más jóvenes (< 65 años) que los pacientes sin reordenamiento en estos puntos ( $p=0,0001$ ), sin que ninguna otra característica de los pacientes al diagnóstico se asociara con la presencia del reordenamiento. Por otra parte, tampoco se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes en que se detectaba el reordenamiento y los que no en cuanto a la tasa de respuesta, la supervivencia libre de progresión y la supervivencia global. Por lo tanto, los resultados obtenidos permiten

concluir que el reordenamiento *BCL-2/IgH* en *MBR* o *mcr*, detectable en el 67% de los pacientes, no se correlaciona con ninguna de las características clínicas al diagnóstico, exceptuando la edad. Asimismo, no se ha demostrado el valor pronóstico del reordenamiento *BCL-2/IgH* en cuanto a la tasa de respuesta, la supervivencia o la supervivencia libre de progresión.

## Incidence and Clinical Significance of *Bcl-2/IgH* Rearrangements in Follicular Lymphoma

SILVIA MONTOTO<sup>a</sup>, ARMANDO LÓPEZ-GUILLERMO<sup>a,\*</sup>, DOLORS COLOMER<sup>b</sup>, JORDI ESTEVE<sup>a</sup>, FRANCESC BOSCH<sup>a</sup>, ANA FERRER<sup>a</sup>, NEUS VILLAMOR<sup>b</sup>, CAROLINA MORENO<sup>b</sup>, ELÍAS CAMPO<sup>b</sup> and EMILI MONTSERRAT<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Hematology Department, Institute of Hematology and Oncology, Postgraduate School of Hematology "Farreras-Valenti" Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, Hospital Clínic of Barcelona, Villarroel 170, 08036-Barcelona, Spain; <sup>b</sup>Hematopathology Unit, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, Hospital Clínic, Barcelona, Spain

(Received 10 July 2002)

*Bcl-2/IgH* rearrangement is the molecular hallmark of follicular lymphoma (FL) which is present in 70–90% of the cases at diagnosis. The clinical significance of this feature is controversial. The aim of this study was to analyze the *bcl-2/IgH* rearrangement by means of a PCR technique, and to correlate molecular findings with clinical characteristics and outcome. Sixty-nine patients (median age, 53 years; male/female ratio: 35/34) diagnosed with FL in a single institution were included in the study. A total of 77 DNA samples were analyzed, 54 were obtained from lymph node biopsy and 23 from peripheral blood or bone marrow. *Bcl-2/IgH* rearrangement was assessed for both the *major breakpoint region* (MBR) and the *minor cluster region* (*mcr*) breakpoints by a PCR technique. Thirty-nine out of sixty patients (65%) with assessable samples were found to have a *bcl-2/IgH* rearrangement in the MBR breakpoint, whereas *bcl-2/IgH* rearrangement in *mcr* was observed in one patient (2%) and no rearrangement at MBR or *mcr* in the remaining 20 patients (33%). Regarding the initial characteristics, patients with *bcl-2/IgH* rearrangements at MBR or *mcr* were younger (<65 years) than those with no rearrangement at these sites ( $p = 0.0001$ ). No differences were found according to *bcl-2/IgH* rearrangement in terms of complete response rate, time to treatment failure and overall survival. In our series *bcl-2/IgH* rearrangement at MBR or *mcr*, which was found in 67% of the patients, was not correlated with response to treatment, survival nor time-to-treatment-failure.

**Keywords:** Follicular lymphoma; *Bcl-2*; Prognosis

### INTRODUCTION

Follicular lymphoma (FL) is one of the most frequent subtypes of lymphoproliferative disorders in Western countries where it accounts for one fourth of all the lymphomas [1]. FL originates in the follicle center and its main histological characteristic is the typical follicular growth pattern. From a cytogenetic point of view FLs are characterized by the t(14;18) translocation that leads to the *bcl-2/IgH* rearrangement. The t(14;18) translocation juxtaposes the *bcl-2* oncogene on chromosome 18 to the immunoglobulin heavy chain gene (*IgH*) on chromosome 14. Most of the breakpoints in *bcl-2* oncogene cluster in two regions named *major breakpoint region* (MBR) and *minor cluster region* (*mcr*). *Bcl-2/IgH* rearrangements are found by different techniques (conventional cytogenetics, *Southern blot*, PCR) in up to 95% of the patients [2–4]. However, these figures, as well as the distribution of the

breakpoint sites in the *bcl-2* oncogene, are extremely variable according to different studies. Thus, in some series the rearrangement at MBR or *mcr* was found in around 40% of the patients [5–9], whereas in others it is detected in 70–80% of the cases [10–13]. Given these facts, a geographical differentiated distribution of the *bcl-2/IgH* rearrangement has been suggested. Furthermore, some authors have hypothesized that the extremely variable incidence of FL among different countries might be related to differences in the frequency of *bcl-2/IgH* rearrangement [5,6].

The prognostic importance of molecular features has been extensively studied in diffuse large cell lymphoma (DLCL), with *bcl-2* over-expression being related to a poor outcome [14–17] and contradictory results concerning *bcl-2* rearrangement [14,16,18]. However, the relationship between *bcl-2* rearrangement and outcome in FL patients has only been assessed in a few studies

\*Corresponding author. Tel.: +34-93-227-55-75. Fax: +34-93-227-54-75. E-mail: alopezg@clinic.ub.es

[18–20]. Moreover, the clinical characteristics and the outcome of FL patients according to the *bcl-2* breakpoints have been investigated in only one study [19].

With this background, the aim of the present study was to analyze the incidence of *bcl-2/IgH* rearrangement and its most important breakpoint sites in FL patients and to investigate the correlation between the molecular features and the clinical characteristics and the outcome of the patients.

## PATIENTS AND METHODS

### Patients and Samples

Sixty-nine patients (median age, 53 years; male/female ratio: 35/34) diagnosed with FL between September 1977 and December 1997 in a single institution were included in the present study. The diagnosis was based on a lymph node biopsy in all the cases. The histological distribution according to the *REAL/WHO* classification was as follows: FL grade I, 24 patients (35%); FL grade II, 35 (51%) and FL grade III, 5 patients (7%) and FL unclassified, 5 patients (7%) [21]. The main initial characteristics of the patients are summarized in Table I. Treatment consisted of monotherapy with alkylating agents, 6 patients (9%); COP (cyclophosphamide, vincristine and prednisone) chemotherapy, 8 patients (12%); adriamycin-containing regimens (in most cases, CHOP: cyclophosphamide, adriamycin, vincristine and prednisone), 52 patients (75%); and other treatments, 3 patients (4%). Radiotherapy was administered in 10 cases due to either the presence of bulky disease or localized (stage I) lymphoma.

TABLE I Main initial characteristics of 69 patients with follicular lymphoma

	No. of patients	Percent
Gender		
Male	35	51
Female	34	49
Age $\geq$ 65 years	16	23
B-symptoms	18	26
Poor performance status (ECOG $\geq$ 2)	11	16
Extranodal involvement $\geq$ 2 sites	16	23
Bulky disease ( $\geq$ 10 cm)	11	16
Bone marrow involvement	44	64
Stage		
I	6	9
II	8	11
III	9	13
IV	46	67
Leukemic expression	13	19
High serum LDH ( $\geq$ 450 IU/l)*	17	25
High serum $\beta$ 2M ( $\geq$ 3 mg/l)*	10	28
International Prognostic Index*		
Low-risk	35	52
Low/intermediate-risk	13	19
High/intermediate-risk	10	15
High-risk	9	13

\* Patients with assessable LDH,  $\beta$ 2M and International Prognostic Index were 67, 36 and 67, respectively.

In each patient, the following data were recorded and analyzed in relation to the *bcl-2/IgH* rearrangement: age, gender, performance status (according to the Eastern Cooperative Oncology Group [ECOG] scale), B-symptoms, histological subtype, hemoglobin, WBC count, leukemic expression, erythrocyte sedimentation rate, serum albumin, lactic dehydrogenase (LDH) and  $\beta$ 2-microglobulin ( $\beta$ 2M) levels, number of nodal and extranodal involved sites, presence of splenomegaly, Ann Arbor stage, bulky disease (defined as a tumor diameter  $\geq$  10 cm), bone marrow infiltration and the International Prognostic Index (IPI). Response to therapy, time to treatment failure and overall survival were analyzed according to the *bcl-2/IgH* rearrangement. Finally, the risk of transformation into a high-grade lymphoma was also studied.

DNA specimens were obtained from the same lymph node samples used for the initial histological diagnosis in 26 patients, and from lymph node biopsies taken at the time of relapse or progression in 23 patients. In all these cases paraffin-embedded tissue was used. Transformation into a high-grade lymphoma was ruled out in the rebiopsied patients. In the remaining 20 patients peripheral blood or bone marrow was used as the source to obtain the DNA samples.

### DNA Extraction and Analysis

DNA extraction from paraffin-embedded samples was carried out according to the proteinase K method as previously described [22], whereas salt precipitation method was used to obtain genomic DNA from peripheral blood or bone marrow [23]. PCR analysis of *bcl-2/IgH* rearrangement was performed by means of the Pharmagen SA kit. Briefly, this system included in the same reaction primers for *MBR*, *mcr* as well as for the  $\beta$ -actin gene. Thus, it was possible to amplify the most frequent breakpoints in *bcl-2/IgH* rearrangement as well as to check DNA integrity in only one reaction. The detection of the amplified DNA is carried out with an ELISA technique using specific probes for *MBR* and *mcr* region and  $\beta$ -actin labeled with biotin [24]. All paraffin-embedded samples and some genomic samples were studied by this method, whereas in the remaining genomic samples *MBR* amplification was analyzed with a conventional nested-PCR [25]. All the *MBR* negative samples were re-analyzed to rule out *bcl-2* rearrangement in *mcr* with a conventional PCR. For that purpose, we slightly modified the protocol described by Ngan *et al.* by using a more internal primer [9,26]. In some cases, an additional *Southern blot* analysis was performed to check the specificity of the amplified DNA. After electrophoresis, gels were transferred overnight to a nitrocellulose membrane with 20  $\times$  SSC buffer. Membranes were hybridized with an oligonucleotide complementary to the *mcr* region using a non-isotopic fluorescent 3' oligolabeling system (Amershan).

DNA integrity was checked in every paraffin-embedded sample by amplification of *bcl-2* oncogene as previously described [9]. The presence of amplifiable DNA was reconfirmed in paraffin-embedded cases without *bcl-2/IgH* rearrangement by amplifying  $\beta$ -actin gene in the same reaction as *MBR* and *mcr* amplification.

### Statistical Analysis

Overall survival (OS) was defined as the time between the date of diagnosis and the date of last follow-up or death. Time to treatment failure (TTF) was considered as the time between the start of treatment to one of the following events: death from any cause, disease progression or relapse, or date of last observation.

To compare the initial features and the response to therapy between those patients with *bcl2/IgH* at *MBR* and *mcr* vs. the remainders a Fischer's exact test (two-tailed) was used. Actuarial survival analysis was performed according to the method described by Kaplan and Meier [27], and the curves compared by the log-rank test [28].

## RESULTS

### *Bcl-2* Rearrangement

Seventy-seven DNA samples were analyzed, including 54 obtained from a lymph node biopsy and 23 from bone marrow or peripheral blood. Eight patients had more than one sample (2 lymph node samples in 5 cases, and both lymph node and bone marrow/peripheral blood sample in 3 cases). Among the 69 patients with an assessable sample, 60 patients (87%) had one sample with intact DNA, checked by *bcl-2* oncogene or  $\beta$ -actin amplification as described. Non-amplifiable DNA specimens corresponded to paraffin-embedded samples in the 9 cases without assessable DNA.

Thirty-nine of the sixty patients (65%) with assessable samples presented with a *bcl-2/IgH* rearrangement at *MBR*, one patient (2%) at *mcr*, whereas no *bcl-2/IgH* rearrangement was detected at *MBR* or *mcr* in the remaining 20 patients (33%). In the *mcr* positive case, the specificity was confirmed by *Southern blot* analysis.

### Initial Features According to the *Bcl-2/IgH* Rearrangement

The most important initial characteristics according to the presence of *bcl-2/IgH* rearrangement are summarized in Table II. The detection of *bcl-2/IgH* rearrangement was not related to the histological subtype (65% rearrangement in grade I, 67% in grade II and 75% in grade III;  $p = 0.92$ ). The percentage of patients with *bcl-2/IgH* rearrangement at *MBR* or *mcr* was higher among younger patients (<65 years) than in patients  $\geq 65$  years (79 vs. 17%,  $p = 0.0001$ ). No significant differences were found between the subgroup of patients with *bcl-2/IgH* rearrangement at *MBR* or *mcr* and those without it at those sites according to any other initial clinical feature. The risk of transformation was also analyzed. Overall, such a risk was of 30% at 8 years. Patients with *bcl-2/IgH* rearrangement at *MBR* or *mcr* presented a trend for a higher risk of transformation than the remainders: 8-year risk of transformation were 38% (95% confidence interval [CI]: 18–58%) vs. 25% (95% CI: 0–66%), respectively ( $p = 0.09$ ).

### *Bcl-2/IgH* Rearrangement, Response to Treatment and Outcome

Among 58 assessable patients, 26 (45%) reached CR, 24 patients (41%) PR while 8 (14%) were considered as non-responders. No differences were found among breakpoint subgroups in terms of CR achievement (44 vs. 47% for *MBR/mcr* and the remainder, respectively,  $p = 0.87$ ).

TABLE II Clinical features of 60 patients with assessable DNA according to *bcl-2/IgH* rearrangement

	<i>MBR/mcr</i> negative, N = 20 (%)	<i>Bcl-2/IgH</i> rearrangement, N = 40 (%)	<i>p</i>
Male gender	35	45	NS
Age $\geq 65$ years	50	5	0.0001
Histologic subtype (REAL)			
I	42	39	
II	52	53	NS
III	5	8	
B-symptoms	40	20	NS
Performance status: ECOG $\geq 2$	25	15	NS
Extranodal involvement $\geq 2$ sites	17	35	NS
Bulky disease ( $\geq 10$ cm)	5	20	NS
Bone marrow involvement	70	60	NS
Stage: III–IV	90	75	NS
Serum LDH $\geq 450$ IU/l	22	27	NS
Serum $\beta 2M \geq 3$ mg/l	30	28	NS
International Prognostic Index			
High/intermediate-risk or high-risk	39	25	NS
CR achievement	47	44	NS
8-yr risk of transformation	25	38	0.09

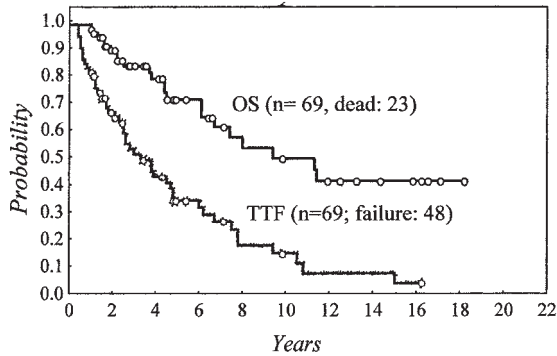


FIGURE 1 Time to treatment failure (TTF) and overall survival (OS) in 69 patients with follicular lymphoma.

The median OS of the series was 9.4 years and the 5- and 10-year OS were 69% (95% CI: 56–82%) and 45% (95% CI: 28–62%), respectively (Fig. 1). The median TTF was 3.3 years and the 5-year TTF 30% (95% CI: 16–44%) (Fig. 1). There were no differences in terms of OS nor in TTF among patients with *bcl-2/IgH* rearrangement and patients negative for *MBR* or *mcr* rearrangement, with the median OS being 11.4 and 6.7 years, respectively ( $p = 0.5$ ) (Fig. 2) and the median TTF, 3.8 and 3.3 years, respectively ( $p = 0.59$ ) (Fig. 3). In the setting of patients who received adriamycin-containing regimens, there were no differences in OS nor in TTF among patients with rearrangement at *MBR* or *mcr* and those without it, with the median OS not reached and 11.3 years, respectively ( $p = 0.64$ ) and the median TTF, 3.8 and 4.8 years, respectively ( $p = 0.93$ ).

## DISCUSSION

In the present study *bcl-2/IgH* rearrangement at *MBR* or *mcr* was found in 67% of the patients with FL. This figure is in accordance with that found in most European series. Thus, Pezella *et al.* found *bcl-2/IgH*

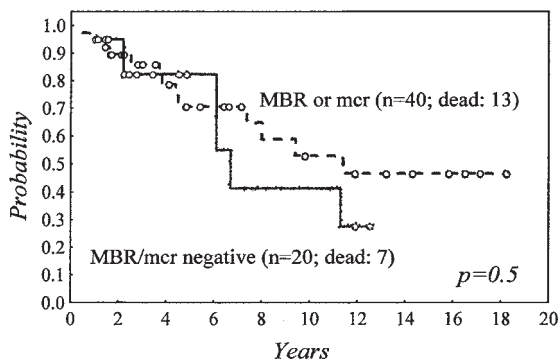


FIGURE 2 Overall survival (OS) according to *bcl-2/IgH* rearrangement.

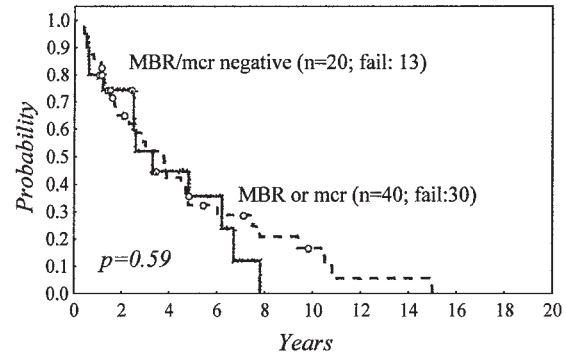


FIGURE 3 Time to treatment failure (TTF) according to *bcl-2/IgH* rearrangement.

rearrangement in 69% of FL patients [20]. Similarly, *bcl-2/IgH* rearrangement was detected in 64 and 67% of the patients in two different French series [12,29]. In contrast, in most American studies the frequency of *bcl-2/IgH* rearrangement is 70–90% [2,10,19], whereas Japanese investigators have found a much lower incidence of t(14;18) translocation (30–40%) [5,6]. It has been hypothesized that the lower incidence of FL in Eastern countries, as compared with that of Western countries, is related to the lower frequency of *bcl-2/IgH* rearrangement, but this is uncertain [5,6]. Regarding the distribution of breakpoints in *bcl-2* oncogene, the present series showed some differences in comparison with other studies. Thus, whereas in this series the proportion of breakpoints at *mcr* was 2%, in Seite *et al.* and Colombat *et al.* series *bcl-2/IgH* rearrangement at *mcr* breakpoint was found in 12 and 8% of the patients, respectively [12,29]. The incidence in American studies is around 10% [10,19] and in one report rearrangement at *mcr* was as high as 31% [2].

The use of different techniques to detect *bcl-2* translocation may result in extremely variable results, with the translocation being detected in up to 89% of the cases studied by cytogenetics and in 66% by PCR analysis [11]. PCR, as used in our study, as well as in others [10,19,29], is a very sensitive method, that is, it is able to detect a small amount of cells with *bcl-2* translocation. However, the PCR technique has some pitfalls when detecting the breakpoint site in a particular patient. In this regard, some technical considerations have to be taken into account. The primers employed are of extreme importance to avoid false negative results. In line with this, the digestion of DNA obtained from paraffin-embedded tissue may yield small fragments, which constitutes a problem especially when trying to amplify relatively long DNA fragments. On the other hand, PCR is easily contaminated, with this easily giving to false positive results. To overcome all these problems appropriate primers for *MBR* and *mcr* breakpoints and internal controls are mandatory [26,30]. Other breakpoint sites in *bcl-2* oncogene have been described,

but the percentage of patients with *bcl-2/IgH* rearrangement outside *MBR* or *mcr* is probably small [12]. Thus, although it might be possible to miss some patients with *bcl-2* rearrangement using only primers for *MBR* and *mcr*, the amount of such missed cases is not expected to be high.

In addition, to rule out the absence of amplifiable DNA in paraffin-embedded samples we checked DNA integrity by amplification of *bcl-2* oncogene and it was reconfirmed in cases without *bcl-2/IgH* rearrangement by amplifying  $\beta$ -actin gene in the same reaction as *MBR* and *mcr* amplification. Therefore, the differences in *mcr* rearrangement found with respect to other studies are most likely due to real differences among patients than to technical inconsistencies.

Regarding the relationship between *bcl-2/IgH* rearrangement and clinical characteristics, age was the only variable statistically related to the detection of *bcl-2/IgH* rearrangement in our study, with younger patients presenting a higher frequency of this molecular feature at *MBR* or *mcr*. This finding was also described in the subset of low grade FL patients in Johnson *et al.* series [7]. In a different setting, Gascoyne *et al.* also detected a higher proportion of *bcl-2/IgH* rearrangements in younger patients with DLCL [16]. Interestingly, there was a trend towards a higher incidence of *bcl-2/IgH* rearrangement in patients with FL experiencing a transformation into a high-grade lymphoma but this fact did not reach statistical significance. However, *bcl-2/IgH* rearrangement was not related to the overall clinical outcome, with patients with *bcl-2/IgH* rearrangement having a prognosis similar to the rest of the patients regarding response rate (RR), OS and TTF. The results of the few studies analyzing this aspect are contradictory. Levine *et al.* and Tilly *et al.* found similar RR and OS in patients with FL studied by cytogenetics [31,32]. Other studies analyzing *bcl-2/IgH* rearrangement by PCR or *Southern blot* showed similar results [20], a higher RR and OS in *bcl-2/IgH* negative patients [18], or a lower RR and OS in *MBR/mcr* negative patients [7,19]. These discrepancies might be due to differences in the populations analyzed.

The small proportion of patients with *bcl-2/IgH* rearrangement at *mcr* in our study prevented us from analyzing the prognostic value of this specific molecular feature. In the only study in which this issue was analyzed a higher disease free survival in *mcr* patients, compared with *MBR* or *MBR/mcr* negative patients, was found [19].

In conclusion, in agreement with other European series, *bcl-2/IgH* rearrangement was detected in 67% of patients with FL, and this finding was more frequent in younger patients. From the clinical standpoint, although patients with *bcl-2/IgH* had a higher tendency to undergo disease transformation than the remainder, the difference did not reach statistical significance. Moreover, no differences were found in terms of relapse rate and overall survival. Finally, further studies should be done to confirm these

observations, and to define molecular characteristics related to the natural history of patients with FL.

### Acknowledgements

This work has been supported in part by grants (98/0996 and 99/0189) from the *Fondo de Investigación Sanitaria*, Spanish Ministry of Health, Spain, and from the *José Carreras International Foundation Against Leukemia* (FJC 00/P-CR and 01/P-EM).

### References

- [1] The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project (1997) "A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma", *Blood* **89**, 3909–3918.
- [2] Weiss, L.M., Warnke, R.A., Sklar, J. and Cleary, M.L. (1987) "Molecular analysis of the t(14;18) chromosomal translocation in malignant lymphomas", *New England Journal of Medicine* **317**, 1185–1189.
- [3] Yunis, J.J., Frizzera, G., Oken, M.M., *et al.* (1987) "Multiple recurrent genomic defects in follicular lymphoma. A possible model for cancer", *New England Journal of Medicine* **316**, 79–84.
- [4] Vaandrager, J.W., Schuurin, E., Raap, T., *et al.* (2000) "Interphase FISH detection of BCL-2 rearrangement in follicular lymphoma using breakpoint-flanking probes", *Genes, Chromosomes and Cancer* **27**, 85–94.
- [5] Amakaya, R., Fukuhara, S., Ohno, H., *et al.* (1989) "Involvement of *bcl-2* gene in Japanese follicular lymphoma", *Blood* **73**, 787–791.
- [6] Takechi, M., Tanaka, K., Hashimoto, T., *et al.* (1991) "Cytogenetic, molecular biological and clinical study of B-cell lymphomas with 14;18 translocation in Japanese patients", *Leukemia* **5**, 1069–1075.
- [7] Johnson, A., Brun, A., Dictor, M., *et al.* (1995) "Incidence and prognostic significance of t(14;18) translocation in follicle center cell lymphoma of low and high grade. A report from southern Sweden", *Annals of Oncology* **6**, 789–794.
- [8] Pezella, F., Ralfkiaer, E., Gatter, K.C. and Mason, D.Y. (1990) "The (14;18) translocation in European cases of follicular lymphoma: comparison of Southern blotting and the polymerase chain reaction", *British Journal of Haematology* **76**, 58–64.
- [9] Miettinen, M. and Lasota, J. (1997) "Polymerase chain reaction based gene rearrangement studies in the diagnosis of follicular lymphoma—Performance in formaldehyde-fixed tissue and application in clinical problem cases", *Pathology Research and Practice* **193**, 9–19.
- [10] Segal, G.H., Jorgensen, T., Scott, M. and Braylan, R.C. (1994) "Optimal primer selection for clonality assessment by polymerase chain reaction analysis: follicular lymphomas", *Human Pathology* **25**, 1276–1282.
- [11] Horsman, D.E., Gascoyne, R.D., Coupland, R.W., *et al.* (1995) "Comparison of cytogenetic analysis, Southern analysis, and polymerase chain reaction for the detection of t(14;18) in follicular lymphoma", *American Journal of Clinical Pathology* **103**, 472–478.
- [12] Seite, P., Hillion, J., D'Agay, M.F., *et al.* (1993) "Bcl-2 gene activation and protein expression in follicular lymphoma: a report on 64 cases", *Leukemia* **7**, 410–417.
- [13] Lee, M.S., Blick, M.B., Pathak, S., *et al.* (1987) "The gene located at chromosome 18 band q21 is rearranged in uncultured diffuse lymphomas as well as follicular lymphomas", *Blood* **70**, 90–95.
- [14] Hill, M.E., MacLennan, K.A., Cunningham, D.C., *et al.* (1996) "Prognostic significance of BCL-2 expression and *bcl-2* major breakpoint region rearrangement in diffuse large cell non-Hodgkin's lymphoma: a British National Lymphoma Investigation Study", *Blood* **88**, 1046–1051.
- [15] Hermine, O., Haioun, C., Lepage, E., *et al.* (1996) "Prognostic significance of *bcl-2* protein expression in aggressive non-Hodgkin's lymphoma", *Blood* **87**, 265–272.
- [16] Gascoyne, R.D., Adomat, S.A., Krajewski, S., *et al.* (1997) "Prognostic significance of Bcl-2 protein expression and Bcl-2 gene rearrangement in diffuse aggressive non-Hodgkin's lymphoma", *Blood* **90**, 244–251.



- [17] Kramer, M.H.H., Hermans, J., Parker, J., *et al.* (1996) "Clinical significance of bcl-2 and p53 protein expression in diffuse large B-cell lymphoma: a population-based study", *Journal of Clinical Oncology* **14**, 2131–2138.
- [18] Yunis, J.J., Mayer, M.G., Arnesen, M.A., Aeppli, D.P., *et al.* (1989) "Bcl-2 and other genomic alterations in the prognosis of large-cell lymphoma", *New England Journal of Medicine* **320**, 1047–1054.
- [19] López-Guillermo, A., Cabanillas, F., McDonnell, T.L., *et al.* (1999) "Correlation of bcl-2 rearrangement with clinical characteristics and outcome in indolent follicular lymphomas", *Blood* **93**, 3081–3087.
- [20] Pezella, F., Jones, M., Ralfkiaer, E., Ersboll, J., *et al.* (1992) "Evaluation of bcl-2 protein expression and 14;18 translocation as prognostic markers in follicular lymphoma", *British Journal of Cancer* **65**, 87–89.
- [21] Harris, N.L., Jaffe, E.S., Stein, H., *et al.* (1994) "A revised European–American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group", *Blood* **84**, 1361–1392.
- [22] Pinyol, M., Campo, E., Nadal, A., *et al.* (1996) "Detection of the bcl-1 rearrangement at the major translocation cluster in frozen and paraffin-embedded tissues of mantle cell lymphomas by polymerase chain reaction", *American Journal of Clinical Pathology* **105**, 532–537.
- [23] Miller, S.A., Dykes, D.D. and Polesky, H.F. (1988) "A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells", *Nucleic Acids Research* **16**, 1215.
- [24] Segal, G.H., Scott, M. and Braylan, R.C. (1996) "Semi-automated ELISA-based detection system for verifying the authenticity of amplified t(14;18)-containing products", *Diagnostic Molecular Pathology* **5**, 114–120.
- [25] Gribben, J.G., Freedman, A.S., Woo, S.D., *et al.* (1991) "All advanced stage non-Hodgkin's lymphomas with a polymerase chain reaction amplifiable breakpoint of bcl-2 have residual cells containing the bcl-2 rearrangement at evaluation and after treatment", *Blood* **78**, 3275–3280.
- [26] Ngan, B.Y., Nourse, J. and Cleary, M.L. (1989) "Detection of chromosomal translocation t(14;18) within the minor cluster region of bcl-2 by polymerase chain reaction and direct genomic sequencing of the enzymatically amplified DNA in follicular lymphomas", *Blood* **73**, 1759–1762.
- [27] Kaplan, G.L. and Meier, P. (1958) "Nonparametric estimation from incomplete observations", *Journal of the American Statistical Association* **53**, 457–481.
- [28] Peto, R. and Pike, M.C. (1973) "Conservatism of the  $\sum(0 - E)^2/E$  in the log-rank test for survival data on tumor incidence data", *Biometrics* **29**, 759–784.
- [29] Colombat, P., Salles, G., Brousse, N., *et al.* (2001) "Rituximab (anti-CD20 monoclonal antibody) as single first-line therapy for patients follicular lymphoma with a low tumor burden: clinical and molecular evaluation", *Blood* **97**, 101–106.
- [30] Crescenzi, M., Seto, M., Herzig, G.P., *et al.* (1988) "Thermoestable DNA polymerase chain amplification of t(14;18) chromosome breakpoints and detection of minimal residual disease", *Proceedings of the National Academy of Science USA* **85**, 4869–4873.
- [31] Levine, E.G., Arthur, D.C., Frizzera, G., *et al.* (1988) "Cytogenetic abnormalities predict clinical outcome in non-Hodgkin lymphoma", *Annals of Internal Medicine* **108**, 14–20.
- [32] Tilly, H., Rossi, A., Stamatoullas, A., *et al.* (1994) "Prognostic values of chromosomal abnormalities in follicular lymphoma", *Blood* **84**, 1043–1049.

## ***4.2. Supervivencia desde la progresión en pacientes con linfoma folicular: análisis de los factores pronósticos.***

### ***4.2.1. Resumen.***

El objetivo de este estudio fue la identificación, en una serie de pacientes con LF en primera recaída o progresión, de los factores pronósticos que pudieran ser de utilidad para seleccionar aquellos pacientes que, dado su alto riesgo, eran merecedores de ser incluidos en estudios dirigidos a analizar el efecto de nuevas aproximaciones terapéuticas. Para ello se incluyeron en el estudio 90 pacientes (48 hombres/42 mujeres, con una mediana de edad de 56 años), diagnosticados de LF en un único centro durante un periodo de 20 años, que se hallaban en recaída o progresión tras haber alcanzado una respuesta completa o parcial con el tratamiento inicial. El principal objetivo del estudio fue el análisis de la supervivencia desde la progresión (SDP). Para la identificación de los factores predictivos para la SDP se realizaron análisis univariados y multivariados incluyendo las principales características de los pacientes en el momento de la progresión, así como la duración de la respuesta (DR) tras el tratamiento inicial. Los resultados obtenidos mostraron una SDP a los 5 años del 47% (IC 95%: 35-58%). Los pacientes con una respuesta inicial de duración superior a 2 años presentaron una SDP significativamente más prolongada que los pacientes con una respuesta más corta (SDP a los 5 años: 63% frente a 33%,  $p=0,012$ ). La única característica al diagnóstico que mostró valor pronóstico para la SDP fue el estadio, mientras que las siguientes variables en la progresión fueron predictivas para la SDP: edad, enfermedad voluminosa, estado general, nivel sérico de LDH, nivel sérico de  $\beta 2$ microglobulina, infiltración medular, estadio e IPI. En el análisis multivariado los factores que retuvieron el valor pronóstico negativo para la SDP fueron el mal estado general en la progresión ( $\text{ECOG} \geq 2$ ) y la

duración de la respuesta inferior a 2 años, de manera que la SDP a los 5 años de los pacientes con un ECOG < 2 y una DR superior a los 2 años fue del 68%, mientras que los pacientes con cualquiera de los 2 factores adversos presentaron una SDP a los 5 años del 36% y aquellos con mal estado general y una duración de la respuesta corta, del 0%. Por último se repitió el análisis multivariado incluyendo el IPI para estudiar su valor pronóstico en pacientes con LF en recaída. El mal estado general en la progresión, la duración de la respuesta corta y el IPI de riesgo intermedio o alto se mostraron como factores adversos para la SDP.

De los resultados obtenidos en este estudio se puede concluir que en pacientes con LF la duración de la respuesta junto con el estado general en la progresión son factores que predicen la SDP y que, por lo tanto, podrían ser útiles para seleccionar candidatos para tratamientos experimentales.

## Survival after progression in patients with follicular lymphoma: analysis of prognostic factors

S. Montoto<sup>1</sup>, A. López-Guillermo<sup>1\*</sup>, A. Ferrer<sup>1</sup>, M. Camós<sup>1</sup>, A. Álvarez-Larrán<sup>1</sup>, F. Bosch<sup>1</sup>, J. Bladé<sup>1</sup>, F. Cervantes<sup>1</sup>, J. Esteve<sup>1</sup>, F. Cobo<sup>1</sup>, D. Colomer<sup>2</sup>, E. Campo<sup>2</sup> & E. Montserrat<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Hematology and <sup>2</sup>Hematopathology Unit, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, Hospital Clinic, Barcelona, Spain

Received 6 August 2001; revised 6 November 2001; accepted 19 November 2001

**Background:** The purpose of this study was to identify prognostic parameters for patients with follicular lymphoma (FL) in first progression/relapse. These would be useful for selection of high-risk patients for inclusion in trials aimed at determining the effect of new treatment approaches in such patients.

**Patients and methods:** Ninety patients (48 male, 42 female, median age 56 years) diagnosed with FL, in a single institution during a 20 year period and relapsing/progressing after an initial response to therapy, were recruited. The main end-point of the study was survival from progression (SFP). Univariate and multivariate analyses were performed, including among the predictive variables the response duration (RD) after the initial treatment and the main features of the patients at the first progression or relapse.

**Results:** Five-year SFP was 47% (95% confidence interval 35% to 58%). Patients with RD following initial therapy >2 years had a longer SFP (5-year SFP 63 versus 33%,  $P = 0.012$ ). Other variables with prognostic interest for SFP were stage at diagnosis and the following variables at relapse: age, bulky disease, performance status, serum lactate dehydrogenase level, serum  $\beta$ 2-microglobulin level, bone marrow involvement, stage and International Prognostic Index rating. In the multivariate analysis, poor performance status at progression and a RD <2 years were the most important unfavorable variables to predict SFP.

**Conclusion:** In patients with FL, RD along with performance status at progression are features that predict SFP. These variables could thus be useful to select candidates for experimental treatments.

**Key words:** follicular lymphoma, outcome, progression

### Introduction

The majority of patients with follicular lymphoma (FL) present with disseminated disease and have a relatively indolent course, the median survival being 6–10 years. However, FL is not curable with conventional therapies, and most patients die from causes related to the disease, frequently after having experienced many relapses [1–4]. Given the above facts, new potentially more effective, but also potentially more toxic, treatments are increasingly being used to treat FL. These include purine analogs, either alone or in combination [5, 6], monoclonal antibodies [7–9], biological agents and stem cell transplantation [10–16]. Although there is evidence that these approaches can be useful, their exact role and the best timing for such treatments are not yet well established. On the other hand, although the toxicity related to some of these

approaches appears to be acceptable [7, 17], the complications caused by other strategies are of concern. For example, the incidence of myelodysplastic syndrome/acute myeloid leukemia (MDS/AML) after stem cell transplantation has been found to be 4–12% [14, 15, 18]. Taking all these facts into account, as well as the responsiveness of the disease to standard treatments and its rather indolent nature, experimental treatments are usually reserved for patients in relapse. Therefore, the analysis of prognostic factors at relapse should be useful to select patients for whom inclusion in experimental trials is warranted.

The aim of the present study was to analyze the prognostic features in a series of patients with FL from a single institution, focusing on the variables at the time of the first relapse or progression that predict survival.

### Patients and methods

#### Initial characteristics and treatment

Two-hundred-and-one patients (median age 54 years; 107 males, 94 females) consecutively diagnosed with FL between January 1977 and

\*Correspondence to: Dr A. López-Guillermo, Department of Hematology, Hospital Clinic, Villarroel 170, 08036-Barcelona, Spain.  
Tel: +34-93-227-5575; Fax: +34-93-227-5428;  
E-mail: alopezg@clinic.ub.es

**Table 1.** Main characteristics of 90 patients with follicular lymphoma at diagnosis and at relapse

	At diagnosis		At relapse	
	No. assessable	Percentage	No. assessable	Percentage
Age $\geq 60$ years	90	30	90	41
B-symptoms	90	21	78	12
Poor performance status (ECOG $\geq 2$ )	90	17	81	11
Bulky disease ( $\geq 10$ cm)	90	23	79	12
Bone marrow involvement	90	62	42	45
Stage	90		82	
I		6		17
II		10		16
III		11		28
IV		73		39
High serum LDH ( $\geq 450$ U/l)	79	25	60	20
High serum $\beta 2M$ ( $\geq 3$ mg/l)	28	36	30	33
International Prognostic Index	79		82 <sup>a</sup>	
Low-risk		43		57
Low/intermediate-risk		32		27
High/intermediate-risk		14		13
High-risk		11		2

<sup>a</sup>Twenty-one patients with unknown LDH and no risk factors were considered low-risk patients (0–1 adverse factors) and one patient with unknown LDH and four adverse factors was considered a high-risk patient (4–5 risk factors).

$\beta 2M$ ,  $\beta 2$ -microglobulin; ECOG, Eastern Cooperative Oncology Group; LDH, lactate dehydrogenase.

December 1997 in a single institution were the basis for this study. The histological distribution according to the Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms/World Health Organization (REAL/WHO) classification [19, 20] was as follows: grade I, 85 patients (42%); grade II, 97 patients (49%); grade III, nine patients (4%); unclassified, 10 patients (5%). Twenty patients (10%) presented with stage I; 19 (9%) with stage II; 31 (15%) with stage III; and 131 (66%) with stage IV. Extranodal involvement was demonstrated in 141 patients, including bone marrow in 123 cases (61%). The distribution of the patients according to the International Prognostic Index (IPI) [21] was as follows: low risk, 89 patients (49%); low/intermediate risk, 50 patients (27%); high/intermediate risk, 24 patients (13%); and high risk, 20 patients (11%).

Initial treatment consisted of: monotherapy with alkylating agents, 29 patients (14%); COP chemotherapy (cyclophosphamide, vincristine and prednisone), 28 patients (14%); adriamycin-containing regimens (in most cases CHOP: cyclophosphamide, adriamycin, vincristine and prednisone), 126 patients (63%); and other treatments, 18 patients.

Among 191 assessable patients, 87 (46%) attained a complete response (CR), 77 (40%) a partial response (PR), while 27 patients (14%) were considered non-responders. After a median follow-up of 4.5 years, 41 of the 87 CR patients (47%) and 49 of 77 PR patients (64%) had progressed. Overall, the median response duration (RD) was 2.3 years. These 90 patients (48 male, 42 female; median age 56 years) who responded to treatment and eventually relapsed/progressed were the subject of the present study. The main characteristics at diagnosis and relapse are listed in Table 1.

### Staging, evaluation at response and follow-up procedures

Initial staging procedures included computed tomography of the thorax, abdomen and pelvis, as well as a bone marrow biopsy. Post-therapy restaging included the repetition of the previously abnormal tests and/or biopsies.

CR was defined as the disappearance of tumor masses and disease-related symptoms, as well as the normalization of the initially abnormal tests and/or biopsies, lasting for at least 1 month. PR was considered as measurable lesions decreased by at least 50% [22]. Patients not included in these categories and those who died before completing treatment were considered non-responders.

The follow-up surveillance procedures after treatment consisted of physical examination, blood count tests and biochemistry, and chest X-ray (if initially abnormal) every 3 months during the first year, every 4 months during the second year, every 6 months during the next 3 years and every year afterwards. When the abdomen was the principally involved site, abdominal computer tomography (CT) scans were performed every 6 months during the first year and yearly for the following 5 years. Molecular follow-up was performed only during the last 4 years (1996–2000).

At the time of clinical relapse or progression, a new lymph node biopsy was performed whenever possible. However, such a procedure was carried out in only half of the patients due to older age, poor performance status or patient refusal. For the same reasons, a new bone marrow biopsy could only be obtained in 42 patients. In addition, restaging of the patients included CT scans of the thorax, abdomen and pelvis.

### Parameters evaluated

In each patient the following data were recorded and evaluated for prognosis. (i) Initial variables: age (<60 versus  $\geq 60$  years), gender, performance status [according to the Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) scale], B-symptoms, histological subtype, hemoglobin, leukocyte count, lymphocyte count, leukemic expression, platelet count, serum albumin, serum lactate dehydrogenase (LDH) and serum  $\beta 2$ -microglobulin ( $\beta 2M$ ) levels, number of nodal and extranodal involved sites, presence of splenomegaly, Ann Arbor stage, bulky disease (defined as a tumor diameter  $\geq 10$  cm), bone marrow infiltration and the IPI. (ii) Treatment: monotherapy with alkylating agents versus combination chemotherapies without adriamycin versus adriamycin-containing regimens. (iii) Response to therapy: CR versus PR versus no response. (iv) RD: defined as the time from response to relapse/progression (<2 versus  $\geq 2$  years). (v) Variables at relapse: (a) clinical data (age, performance status, presence of B-symptoms); (b) histological subtype (FL versus transformed into high-grade lymphoma); (c) tumor extension data (bulky disease, Ann Arbor stage, extranodal involvement, bone marrow involvement, serum LDH and  $\beta 2M$ ); (d) IPI; (e) salvage treatment; and (f) response to salvage treatment.

### Statistical analysis

Overall survival was defined as the time between the date of diagnosis and the date of last follow-up or death; cause-specific survival, as the date of diagnosis to the date of last follow-up or lymphoma-related death; time to treatment failure (TTF), as the start of treatment to one of the following events: death from any cause, disease progression or relapse, or date of last observation [22]. Survival from progression (SFP) for responding patients (CR or PR) was defined as the time from relapse or progression to the date of last follow-up or death [23]. Cause-specific SFP for responding patients (CR or PR) was defined as the time from relapse or progression to the date of last follow-up or lymphoma-related death.

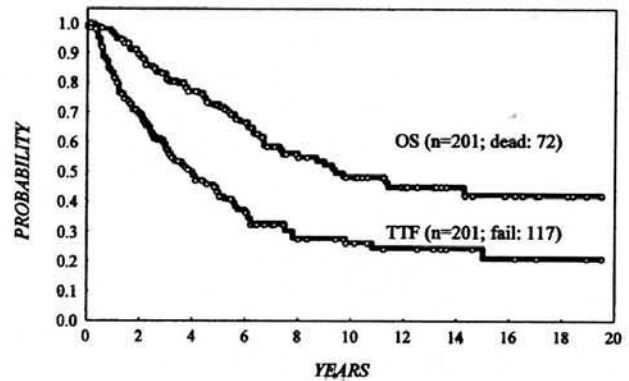
The main end point of the study was SFP. In addition, TTF and overall survival were analyzed. Actuarial survival analysis was performed according to the method described by Kaplan and Meier [24], and the curves compared by the log-rank test [25]. The univariate analysis was carried out for each of the parameters indicated above. All significant prognostic factors in the univariate study were included in a multivariate analysis performed by Cox's stepwise proportional hazard regression method [26].

## Results

### Time to treatment failure and overall survival in the whole series

TTF in the overall series (201 patients) is plotted in Figure 1. Five-year TTF was 42% [95% confidence interval (CI) 34% to 49%].

Seventy-two patients died during the follow-up period. The median overall survival was 9.3 years, and the 5-year and 10-year overall survival were 71% (95% CI 65% to 76%) and 48% (95% CI 39% to 57%), respectively (Figure 1). Eleven patients (15%) died from non-lymphoma-related causes, with a median cause-specific survival of 14.3 years.



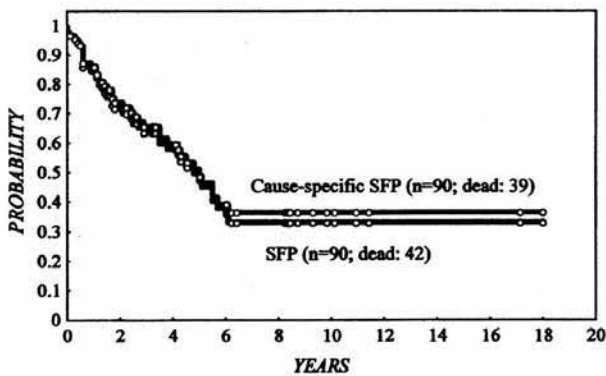
**Figure 1.** Time to treatment failure (TTF) and overall survival (OS) in 201 patients with follicular lymphoma. Five-year TTF: 42% (95% CI 34% to 49%). Five-year OS: 71% (95% CI 65% to 76%).

### Characteristics of the patients at progression, salvage therapy and response

Of 164 responders, 90 (55%) presented with disease progression or relapse during the follow-up period. These patients had been registered from January 1976 to August 1997, with a median follow-up for alive patients of 6.25 years (range 2.1–21.6 years). The median age at progression was 56 years (range 26–78 years). The most important characteristics of these patients both at diagnosis and at progression are listed in Table 1. Among 82 assessable patients, 55 (67%) were in advanced stage and 35 (42%) had an intermediate- or high-risk prognosis, according to the IPI. Among 45 rebiopsed patients, histological transformation into a high-grade lymphoma was observed in nine cases (20%) (diffuse large-cell lymphoma in all of these). Patients in whom a new biopsy was not performed were older than those rebiopsed (patients  $\geq 65$  years, 33% versus 13%, respectively;  $P = 0.04$ ). Treatment at progression varied during the study period and consisted of: monotherapy with alkylating agents, 27 patients (30%); combination chemotherapy, 40 patients (45%); fludarabine alone or in combination, 12 patients (13%); and other treatments, 11 patients (12%) including only radiotherapy in three stage I patients. In addition, stem cell transplantation was performed in seven cases as part of the salvage treatment. In the subset of nine patients, in whom histological transformation was diagnosed, combination chemotherapy was given in all the cases, followed by autologous stem cell transplantation in four cases. Thirty-four (41%) of 83 assessable patients had a CR, 29 (35%) a PR, while 20 patients (24%) were considered as non-responders.

### Survival from progression

The median SFP was 4.8 years, with a 5-year SFP of 47% (95% CI 35% to 58%) (Figure 2). The most important variables predicting SFP are detailed in Table 2. As indicated,



**Figure 2.** Survival from progression (SFP) and cause-specific survival from progression (cause-specific SFP) in 90 responding patients who eventually progressed. Five-year SFP: 47% (95% CI 35% to 58%). Five-year cause-specific SFP 48% (95% CI 36% to 60%).

advanced stage at diagnosis was the only initial factor retaining predictive value for SFP. First-line therapy did not influence SFP. In the univariate analysis, unfavorable prognostic factors at progression were bulky disease, poor performance status, high serum LDH level, high serum  $\beta$ 2M, bone marrow involvement, advanced stage, intermediate- or high-risk IPI, and an RD <2 years. Older age ( $\geq 60$  years) showed a trend for statistical significance. Regarding salvage therapy, there were no differences in SFP according to the salvage regimen used, including ASCT. There was a trend for a higher SFP in patients receiving fludarabine combinations ( $P = 0.09$ ), but these patients were highly selected in terms of age, performance status and follow-up. A relatively high number of missing data was found for four of these variables (LDH,  $\beta$ 2M, bone marrow involvement and transformation). We analyzed the SFP for patients with known data versus those with missing data. Patients with unknown LDH, bone marrow or lymph node biopsy had a worse SFP than the others, whereas no significant differences were found for  $\beta$ 2M (data not shown). The SFP according to the RD is shown in Figure 3. When the same analysis was performed in the subset of patients in advanced stage at progression, no significant differences were found according to the RD [5-year SFP: 21% (95% CI 0% to 44%) and 45% (95% CI 19% to 70%) for RD <2 and RD  $\geq 2$  years, respectively;  $P =$  not significant]. In the subgroup of patients in localized stage, the RD maintained its prognostic significance with a 5-year SFP of 38% (95% CI 7% to 69%) in patients with a RD <2 years and a 5-year SFP of 92% (95% CI 78% to 100%) in patients with a longer RD ( $P = 0.013$ ). When RD and stage were compared by a Cox regression, only stage retained prognostic significance for SFP [ $P = 0.015$ , relative risk (RR) 2.9 (95% CI 1.2–6.8)]. The univariate analysis was carried out for the subgroup of patients <60 years old, with this showing the same prognostic factors for SFP (data not shown). On the other hand, among the 45 patients in whom a new lymph node biopsy was obtained,

no differences in survival were found according to the histological transformation event [5-year SFP 63% (95% CI 44% to 82%) and 62% (95% CI 29% to 95%) for transformed and non-transformed patients, respectively]. Non-biopsed patients had a shorter SFP than biopsed patients [5-year SFP 32% (95% CI 16% to 48%) versus 62% (95% CI 46% to 78%);  $P = 0.004$ ].

For the multivariate analysis all the variables with prognostic significance in the univariate study ( $P$  value <0.1) and with a sufficient number of assessable cases were selected. As a result, LDH level,  $\beta$ 2M level, bone marrow involvement and the histology at relapse were not included. On the other hand, response to initial treatment (CR versus PR) was included, due to its clinical interest. Finally, a multivariate analysis was performed including stage at diagnosis (I–II versus III–IV), initial clinical response (CR versus PR), age at relapse (continuous variable), stage at relapse (I–II versus III–IV), bulky disease at relapse, performance status at relapse (ECOG <2 versus ECOG  $\geq 2$ ) and RD (<2 versus  $\geq 2$  years). Seventy-nine of the 90 study patients were included in the final multivariate analysis for SFP. The factors retaining prognostic importance for SFP were: RD [ $P = 0.011$ , RR 0.37 (95% CI 0.17–0.8)] and poor performance status at progression [ $P < 0.001$ , RR 9.0 (95% CI 3.6–22)]. As can be observed in Figure 4, only 10 of the 33 patients with ECOG <2 and RD  $\geq 2$  died during the follow-up, with a 5-year SFP of 68% (95% CI 50% to 86%). Five-year SFP was 36% (95% CI 16% to 56%) for those patients having one of the two unfavorable variables, and 0% for those presenting the two unfavorable variables. Finally, in order to assess the prognostic value of the IPI in the setting of relapsed patients, we performed the multivariate analysis including the IPI at relapse, along with the above-mentioned variables. Poor performance status at progression [ $P = 0.0008$ ; RR 5.09 (95% CI 1.9–13.3)], intermediate- or high-risk IPI at progression [ $P = 0.025$ ; RR 2.5 (95% CI 1.1–5.5)] and an RD <2 years [ $P = 0.02$ ; RR 2.4 (95% CI 1.14–5.3)] retained prognostic value for SFP when we included IPI at relapse in the multivariate analysis. In the subgroup of patients <60 years old, the multivariate analysis showed that performance status ( $P < 0.001$ ) and RD ( $P = 0.01$ ), in addition to bulky disease at progression ( $P = 0.001$ ), were the most important features for predicting SFP.

#### Cause-specific survival from progression

Thirty-nine of 90 relapsed patients died from lymphoma, whereas three patients died from non-lymphoma related causes. Five-year cause-specific SFP was 48% (95% CI 36% to 60%) (Figure 2). A multivariate analysis was carried out following the above criteria. Performance status at relapse [ $P = 0.002$ ; RR 5.1 (95% CI 1.8–14.1)] and RD [ $P = 0.04$ ; RR 0.4 (95% CI 0.2–0.9)] emerged as the most important variables to predict cause-specific SFP.

**Table 2.** Prognostic factors for survival from progression in 90 patients with follicular lymphoma who presented with relapse: results of the univariate analysis

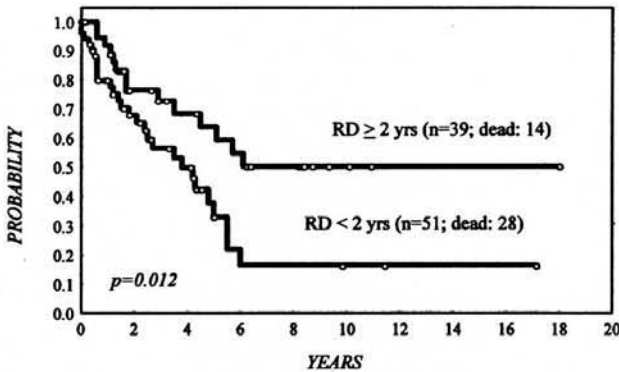
Variable	No. of patients	Mortality (%)	5-year SFP	<i>P</i>
<b>Stage at diagnosis</b>				
I-II	14	14	82	0.02
III-IV	76	53	42	
<b>Age</b>				
<60 years	53	41	60	0.07
≥60 years	37	54	28	
<b>Bulky disease</b>				
No	70	35	54	0.007
Yes	9	89	22	
<b>ECOG</b>				
0-1	71	37	53	0.0002
≥2	10	90	11	
<b>Serum LDH level</b>				
<450 U/l	48	27	56	0.015
≥450 U/l	12	67	44	
<b>Serum β2M level</b>				
<3 mg/l	20	25	58	0.0003
≥3 mg/l	10	100	0	
<b>Bone marrow involvement</b>				
No	23	17	81	0.002
Yes	19	53	23	
<b>Stage</b>				
I-II	27	26	68	0.003
III-IV	55	51	34	
<b>International Prognostic Index</b>				
low-risk	47	25	72	<0.0001
intermediate/high-risk	35	66	13	
<b>Duration of response</b>				
<2 years	51	55	33	0.012
≥2 years	39	36	63	
<b>Transformation</b>				
No	36	33	63	NS
Yes	9	33	62	
<b>Initial response</b>				
CR	41	44	44	NS
PR	49	49	48	
<b>Salvage treatment</b>				
Fludarabine-containing regimens	12	0	NA <sup>a</sup>	NS
Other chemotherapies	67	55	40	
<b>Response to salvage therapy</b>				
CR	34	26	57	<0.0001
PR	29	48	59	
NR	20	90	0	

<sup>a</sup>The median follow-up from the time of progression of patients receiving fludarabine was 2.3 years (range 0.3-4.5).

All the variables are considered at relapse, except when specified.

β2M, β2-microglobulin; CR, complete response; ECOG, Eastern Cooperative Oncology Group; LDH, lactate dehydrogenase; NA, not applicable; NR, no response; NS, not significant; PR, partial response; SFP, survival from progression.





**Figure 3.** Survival from progression according to the duration of response (RD) to first-line therapy. Five-year SFP 63% (95% CI 45% to 80%) and 33% (95% CI 17% to 48%), for patients with RD  $\geq 2$  years and RD  $< 2$  years, respectively.

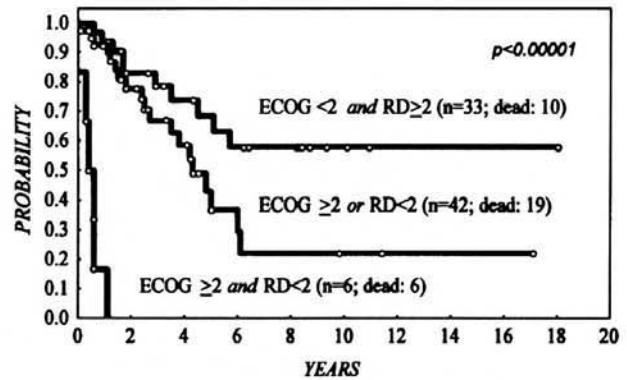
## Discussion

FL is among the most frequent forms of lymphomas in Western countries, where it accounts for 22% of all lymphomas. The median age of the patients at diagnosis was 59 years and the prognosis extremely variable, the median survival in recent series being up to 10 years [1–4, 27]. FL is incurable with standard therapies.

The prognostic factors for patients with FL at diagnosis have been extensively investigated. Thus, older age, poor performance status, advanced stage, bulky disease, leukemic expression, high serum LDH and  $\beta 2M$  levels, and a high risk according to the IPI have consistently been found to be associated with a poor outcome [1, 2, 28–35]. The prognostic significance of many of these variables (i.e. age, stage and LDH) has been confirmed in our series (data not shown).

The natural history of FL is characterized by continuous relapses that become progressively less sensitive to chemotherapy [1]. Although patients with relapsed FL often still respond to further therapy, the RD becomes shorter after each relapse [1] and most patients die due to the disease. All of the above make the management of these patients challenging, with a wide variety of treatment options ranging from a watchful waiting policy to intensive therapies [10–16, 36–42].

New therapeutic approaches are being developed and investigated. These include purine analogs alone or in combination [5, 6], monoclonal antibodies [7–9], high-dose therapy followed by autologous or allogeneic stem-cell transplantation [10–16], as well as different biological response modifiers. Preliminary data in selected patients receiving intensive regimens indicate that CR rates are high (up to 90%) and that such responses may be maintained for long periods [5, 11, 16]. However, no differences in terms of survival between conventional and more intensive treatments have been found [10]. Whereas experimental therapies are rarely used at diagnosis, with the exception of investigational trials, such approaches, particularly autologous stem cell transplantation, are increas-



**Figure 4.** Survival from progression according to performance status (ECOG) and the response duration (RD) ( $P < 0.00001$ ). Five-year SFP 68% (95% CI 50% to 86%), 36% (95% CI 16% to 56%) and 0%, for patients with ECOG  $< 2$  and RD  $\geq 2$ , ECOG  $\geq 2$  or RD  $< 2$ , and patients with ECOG  $\geq 2$  and RD  $< 2$ , respectively.

ingly being offered to patients in disease progression [10–16]. However, patients in whom the disease progresses may still have a relatively long survival with conventional management [1]. On the other hand, the morbidity with some of the new therapies can be high and their long-term toxicity is still largely unknown. This is particularly true with autologous stem-cell transplants, which have been associated in recent analysis with an incidence of MDS/AML ranging from 4 to 12% [14, 15, 18]. Given all these facts, the analysis of prognostic factors at the time of the first relapse or progression could be useful in identifying those patients in whom, due to their extremely poor prognosis, experimental therapies are warranted.

Whereas the prognostic variables of patients with FL at diagnosis have been largely investigated [1, 2, 28–35], the prognosis of patients in relapse or progression has been less studied. Advanced age, presence of B-symptoms, anemia and extensive extranodal involvement have been identified as unfavorable clinical characteristics for survival after progression [23, 43, 44]. In the present study, some clinical characteristics at relapse (stage, bulky, performance status and IPI) showed their prognostic value for SFP. Age, although showing a trend for statistical significance, did not reach prognostic value in the multivariate analysis. In fact, the median age in the present series is slightly lower than in others [1, 27, 42]. The number of previous therapies has also been found to be an important factor to predict survival [43, 44]. Finally, other studies [23, 45] showed the importance of the response to the initial therapy and its duration, as well as the response to salvage therapy in the survival of the patients. The prognostic impact of RD, a variable of well known importance in large-cell lymphoma as well as in other malignancies [46, 47], has only been investigated in a few studies. Weisdorf et al. [23] found age at relapse  $< 60$  years, CR and a RD  $> 1$  year to be associated with a longer survival after progression (5-year

SFP was 43% for patients with a RD  $\geq 1$  year, whereas it was 28% for patients with a shorter RD;  $P = 0.0002$ ). In this study, however, no features at relapse, apart from age, were analyzed. Regarding salvage therapy, although there was a trend for a higher SFP among patients who received fludarabine combinations, these patients were younger and their follow-up shorter than the others. On the other hand, molecular response has also been demonstrated to correlate with outcome in FL patients [48], but this is rarely applicable in routine clinical practice. Moreover, the prognostic importance of molecular follow-up in FL patients is not yet well established.

One limitation of our study, as well as of other studies dealing with patients at relapse, is the difficulty in performing an adequate staging at the moment of relapse or progression. For instance, in our series a bone marrow biopsy was repeated in only 42 of 90 patients. This could lead to relative downstaging of the patients and, subsequently, to decreased IPI scores. Similarly, a new lymph node biopsy to rule out transformation into a high-grade lymphoma was performed in just half of the patients. The main reasons for this were the older age and poor performance status of some patients (inviting us to spare such procedures) and patient's refusal in some cases. Therefore, although we did not find differences among transformed and non-transformed patients, the lack of adverse impact on SFP of histological transformation is most likely due to the low number of cases, and no firm conclusions can be drawn in this regard. On the other hand, those patients in whom no lymph node or bone marrow biopsies or LDH determination were performed showed an unfavorable SFP; this stresses that these procedures were omitted in older patients with poor performance status.

In the present study, RD emerged as an important prognostic factor, with a 5-year SFP ranging from 33% (RD  $< 2$  years) to 63% (RD  $\geq 2$  years); this cut-off was chosen because it was close to the median RD (2.3 years) (Figure 3). In the multivariate analysis, poor performance status at relapse along with RD retained prognostic significance for survival. The same variables, as well as bulky disease at relapse retained prognostic significance for survival in the subset of younger ( $< 60$  years) patients. This indicates that not only the RD, but also clinical characteristics at progression, are critical to determining the outcome for these patients. Interestingly, patients with no unfavorable variables (ambulatory performance status and RD  $\geq 2$  years) had an excellent outcome after progression with a 5-year survival of 68%. These patients should probably not be considered for experimental treatments, particularly those that are potentially toxic. On the other hand, the median SFP of those patients with any risk factor is  $< 5$  years and therefore they may be candidates for experimental and intensive regimens. Of note, the degree of response to first-line therapy (CR versus PR) had only marginal significance in the multivariate analysis both in the whole series and in the group of patients  $< 60$  years of age. However, this is in contrast to another study, in which RD and features at relapse were not analyzed together [23].

In conclusion, clinical characteristics at progression, as well as the duration of first response to therapy, are factors that can be useful to select patients with FL as candidates for experimental therapies and to determine the most appropriate timing for such procedures.

## Acknowledgements

This work was supported in part by grants (98/0996 and 99/0189) from the Fondo de Investigación Sanitaria, Spanish Ministry of Health, Spain, Generalitat de Catalunya (1997XT-00023) and 00/P-EM.

## References

- Gallagher CJ, Gregory WM, Jones AE et al. Follicular lymphoma: prognostic factors for response and survival. *J Clin Oncol* 1986; 4: 1470-1480.
- Romaguera JE, McLaughlin P, North L et al. Multivariate analysis of prognostic factors in stage IV follicular low-grade lymphoma: a risk model. *J Clin Oncol* 1991; 9: 762-769.
- Lister TA. The management of follicular lymphoma. *Ann Oncol* 1991; 2 (Suppl 2): 131-135.
- López-Guillermo A, Montserrat E, Bosch F et al. Low-grade lymphoma: clinical and prognostic studies in a series of 143 patients from a single institution. *Leuk Lymphoma* 1994; 15: 159-165.
- Keating MJ, McLaughlin P, Cabanillas F. Low-grade non-Hodgkin's lymphoma—development of a new effective combination regimen (fludarabine, mitoxantrone and dexamethasone; FND). *Eur J Cancer Care (Engl)* 1997; 6 (4 Suppl): 21-26.
- Zinzani PL, Bendandi M, Magagnoli M et al. Fludarabine-mitoxantrone combination-containing regimen in recurrent low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Ann Oncol* 1997; 8: 379-383.
- McLaughlin P, Grillo-López AJ, Link BK et al. Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program. *J Clin Oncol* 1998; 16: 2825-2833.
- Gordon LI, White CA, Witzig TE et al. Zevalin™ (IDEC-Y2B8) radioimmunotherapy of Rituximab refractory follicular non-Hodgkin's lymphoma (NHL): interim results. *Blood* 1999; 94 (Suppl 1): 91a (Abstr 396).
- Vose JM, Zelenetz AD, Rohatiner A et al. Iodine I 131 tositumomab for patients with follicular non-Hodgkin's lymphoma (NHL): overall clinical trial experience by histology. *Blood* 1999; 94 (Suppl 1): 89a (Abstr 387).
- Rohatiner AZ, Johnson PW, Price CG et al. Myeloablative therapy with autologous bone marrow transplantation as consolidation therapy for recurrent follicular lymphoma. *J Clin Oncol* 1994; 12: 1177-1184.
- Bastion Y, Brice P, Haioun C et al. Intensive therapy with peripheral blood progenitor cell transplantation in 60 patients with poor-prognosis follicular lymphoma. *Blood* 1995; 86: 3257-3262.
- Bierman PJ, Vose JM, Anderson JR et al. High-dose therapy with autologous hematopoietic rescue for follicular low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 1997; 15: 445-450.
- Apostolidis J, Gupta RK, Grenzelias D et al. High-dose therapy with autologous bone marrow support as consolidation of remission in follicular lymphoma: long-term clinical and molecular follow-up. *J Clin Oncol* 2000; 18: 527-536.

14. Micallef IN, Lillington DM, Apostolidis J et al. Therapy-related myelodysplasia and secondary acute myelogenous leukemia after high-dose therapy with autologous hematopoietic progenitor-cell support for lymphoid malignancies. *J Clin Oncol* 2000; 18: 947-955.
15. Freedman AS, Neuberg D, Mauch P et al. Long-term follow-up of autologous bone marrow transplantation in patients with relapsed follicular lymphoma. *Blood* 1999; 94: 3325-3333.
16. Verdonck LF, Dekker AW, Lokhorst HM et al. Allogeneic versus autologous bone marrow transplantation for refractory and recurrent low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1997; 90: 4201-4205.
17. Cheson BD, Vena DA, Barrett J, Freidlin B. Second malignancies as a consequence of nucleoside analog therapy for chronic lymphoid leukemias. *J Clin Oncol* 1999; 17: 2454-2460.
18. Krishnan A, Bhatia S, Slovak ML et al. Predictors of therapy-related leukemia and myelodysplasia following autologous transplantation for lymphoma: an assessment of risk factors. *Blood* 2000; 95: 1588-1593.
19. Harris NL, Jaffe ES, Stein H et al. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood* 1994; 84: 1361-1392.
20. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J et al. The World Health Organization classification of neoplasms of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the clinical advisory committee meeting-Airlie House, Virginia, November, 1997. *Ann Oncol* 1999; 10: 1419-1432.
21. The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project. A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma: The International NHL Prognostic Factors Project. *N Engl J Med* 1993; 329: 987-994.
22. Cheson BD, Horning SJ, Coiffier B et al. Report of an international workshop to standardize response criteria for non-Hodgkin's lymphomas. NCI Sponsored International Working Group. *J Clin Oncol* 1999; 17: 1244-1253.
23. Weisdorf DJ, Andersen JW, Glick JH, Oken MM. Survival after relapse of low-grade non-Hodgkin's lymphoma: implications for marrow transplantation. *J Clin Oncol* 1992; 10: 942-947.
24. Kaplan GL, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc* 1958; 53: 457-481.
25. Peto R, Pike MC. Conservatism of the approximation  $\Sigma(O-E)^2/E$  in the log-rank test for survival data or tumor incidence data. *Biometrics* 1973; 29: 579-584.
26. Cox DR. Regression models and life tables. *J R Stat Soc (B)* 1972; 34: 187-220.
27. The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1997; 89: 3909-3918.
28. Cabanillas F, Smith T, Bodey GP et al. Nodular malignant lymphomas: factors affecting complete response rate and survival. *Cancer* 1979; 44: 1983-1989.
29. Soubeyran P, Eghbali H, Bonichon F et al. Low-grade follicular lymphomas: analysis of prognosis in a series of 281 patients. *Eur J Cancer* 1991; 27: 1606-1613.
30. Litam P, Swan F, Cabanillas F et al. Prognostic value of serum  $\beta$ -2 microglobulin in low-grade lymphoma. *Ann Intern Med* 1991; 114: 855-860.
31. Leonard RC, Hayward RL, Prescott RJ, Wang J-X. The identification of discrete prognostic groups in low grade non-Hodgkin's lymphoma. The Scotland and Newcastle Lymphoma Group Therapy Working Party. *Ann Oncol* 1991; 2: 655-662.
32. Cameron DA, Leonard RC, Mao JH, Prescott RJ. Identification of prognostic groups in follicular lymphoma. The Scotland and Newcastle Lymphoma Group Therapy Working Party. *Leuk Lymphoma* 1993; 10: 89-99.
33. Federico M, Vitolo U, Zinzani PL et al. Prognosis of follicular lymphoma: a predictive model based on a retrospective analysis of 987 cases. Intergruppo Italiano Linfomi. *Blood* 2000; 95: 783-789.
34. Coiffier B, Bastion Y, Berger F et al. Prognostic factors in follicular lymphomas. *Semin Oncol* 1993; 20 (Suppl 5): 89-95.
35. López-Guillermo A, Montserrat E, Bosch F et al. Applicability of the International Index for aggressive lymphomas to patients with low-grade lymphoma. *J Clin Oncol* 1994; 12: 1343-1348.
36. Horning SJ, Rosenberg SA. The natural history of initially untreated low-grade non-Hodgkin's lymphomas. *N Engl J Med* 1984; 311: 1471-1475.
37. Case DC Jr. Comparison of M-2 protocol with COP in patients with nodular lymphoma. *Oncology* 1984; 41: 159-163.
38. McLaughlin P, Fuller LM, Velasquez WS et al. Stage III follicular lymphoma: durable remissions with a combined chemotherapy-radiotherapy regimen. *J Clin Oncol* 1987; 5: 867-874.
39. Young RC, Longo DL, Glatstein E et al. The treatment of indolent lymphomas: watchful waiting versus aggressive combined modality treatment. *Semin Hematol* 1988; 25: 11-16.
40. McLaughlin P, Fuller L, Redman J et al. Stage I-II low-grade lymphomas: a prospective trial of combination chemotherapy and radiotherapy. *Ann Oncol* 1991; 2 (Suppl 2): 137-140.
41. Mac Manus MP, Hoppe RT. Is radiotherapy curative for stage I and II low-grade follicular lymphoma? Results of a long-term follow-up study of patients treated at Stanford University. *J Clin Oncol* 1996; 14: 1282-1290.
42. Wood LA, Coupland RW, North SA, Palmer MC. Outcome of advanced stage low grade follicular lymphomas in a population-based retrospective cohort. *Cancer* 1999; 85: 1361-1368.
43. Johnson PW, Rohatiner AZ, Whelan JS et al. Patterns of survival in patients with recurrent follicular lymphoma: a 20-year study from a single center. *J Clin Oncol* 1995; 13: 140-147.
44. Spinolo JA, Cabanillas F, Dixon DO et al. Therapy of relapsed or refractory low-grade follicular lymphomas: factors associated with complete remission, survival and time to treatment failure. *Ann Oncol* 1992; 3: 227-232.
45. Davidge-Pitts M, Dansey R, Bezwoda WR. Prolonged survival in follicular non Hodgkin's lymphoma is predicted by achievement of complete remission with initial treatment: results of a long term study with multivariate analysis of prognostic factors. *Leuk Lymphoma* 1996; 24: 131-140.
46. Guglielmi C, Gomez F, Philip T et al. Time to relapse has prognostic value in patients with aggressive lymphoma enrolled onto the Parma trial. *J Clin Oncol* 1998; 16: 3264-3269.
47. Kern W, Schoch C, Haferlach T et al. Multivariate analysis of prognostic factors in patients with refractory and relapsed acute myeloid leukemia undergoing sequential high-dose cytosine arabinoside and mitoxantrone (S-HAM) salvage therapy: relevance of cytogenetics abnormalities. *Leukemia* 2000; 14: 226-231.
48. López-Guillermo A, Cabanillas F, McLaughlin P et al. The clinical significance of molecular response in indolent follicular lymphomas. *Blood* 1998; 91: 2955-2960.

### **4.3. Valor predictivo del “Follicular Lymphoma International Prognostic Index” (FLIPI) en pacientes con linfoma folicular en primera recaída.**

#### **4.3.1. Resumen.**

Pese a que se han propuesto diversos índices pronósticos para clasificar a los pacientes con LF en diferentes grupos de riesgo según las características clínicas que presentan al diagnóstico, ninguno de ellos ha sido ampliamente aceptado. En este contexto recientemente se ha publicado el *Follicular Lymphoma International Prognostic Index* (FLIPI), un índice pronóstico específicamente diseñado para pacientes con LF que clasifica a los pacientes en 3 grupos con un pronóstico sumamente diferente en el momento del diagnóstico. El objetivo del presente estudio, en la misma línea que el anterior trabajo, fue analizar el posible valor pronóstico de este índice en pacientes con LF en primera recaída o progresión. Así, se incluyeron en el estudio 103 pacientes (55 hombres/48 mujeres, con una mediana de edad de 59 años) que se hallaban en primera recaída o progresión tras haber alcanzado una respuesta completa (50) o parcial (53) tras el tratamiento inicial. La supervivencia desde la progresión (SDP) a los 5 años de los pacientes de esta serie fue 55% (IC 95%: 44-66%). Los pacientes se distribuyeron según el FLIPI en la recaída de la siguiente manera: 39% en el grupo de riesgo bajo; 24%, riesgo intermedio; 37% riesgo alto. La SDP a los 5 años para estos 3 grupos fue 85%, 79% y 28%, respectivamente ( $p < 0,0001$ ). En este estudio otras variables que mostraron valor predictivo en la recaída para la SDP fueron la edad, la presencia de síntomas B, el estado general, la presencia de enfermedad voluminosa, el número de áreas ganglionares afectas, el nivel sérico de LDH, el nivel de Hb, la existencia de transformación histológica, el índice pronóstico para LF del *Italian Lymphoma Intergroup* y el IPI. En el análisis multivariado la presencia de enfermedad voluminosa

( $p=0,01$ ), la presencia de síntomas B ( $p=0,03$ ) y el FLIPI en la recaída ( $p=0,0003$ ) aparecieron como las variables más importantes para predecir la SDP.

De acuerdo con los resultados de dicho estudio, es posible concluir que en los pacientes con LF en primera recaída o progresión el FLIPI, así como la existencia de enfermedad voluminosa o síntomas B, son características que influyen en la SDP y que, por lo tanto, podrían ser de utilidad para seleccionar candidatos a tratamientos experimentales.

## Predictive value of Follicular Lymphoma International Prognostic Index (FLIPI) in patients with follicular lymphoma at first progression

S. Montoto<sup>1</sup>, A. López-Guillermo<sup>1\*</sup>, A. Altés<sup>2</sup>, G. Perea<sup>2</sup>, A. Ferrer<sup>1</sup>, M. Camós<sup>1</sup>, L. Villela<sup>2</sup>, F. Bosch<sup>1</sup>, J. Esteve<sup>1</sup>, F. Cervantes<sup>1</sup>, J. Bladé<sup>1</sup>, B. Nomdedeu<sup>1</sup>, E. Campo<sup>1</sup>, J. Sierra<sup>2</sup> & E. Montserrat<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Hematology and Hematopathology Unit, Hospital Clínic, IDIBAPS, Barcelona; <sup>2</sup>Department of Hematology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain

Received 22 March 2004; revised 27 May 2004; accepted 2 July 2004

**Background:** Different prognostic scores have been proposed to predict the outcome of follicular lymphoma (FL) patients at diagnosis. A new prognostic index specifically addressing FL patients, the Follicular Lymphoma International Prognostic Index (FLIPI), has recently been developed, which might be also useful in patients with progression.

**Patients and methods:** One hundred and three patients (55 male, 48 female; median age 59 years) with FL in first relapse/progression after an initial response to therapy (50 complete responders/53 partial responders) were included in the study.

**Results:** Five-year survival from progression (SFP) was 55% (95% confidence interval 44% to 66%). The distribution according to the FLIPI at relapse was 39% good prognosis, 24% intermediate prognosis and 37% poor prognosis. Five-year SFP for these groups were 85%, 79% and 28%, respectively ( $P < 0.0001$ ). Other variables at relapse with prognostic significance for SFP were age, presence of B symptoms, performance status, bulky disease, number of involved nodal sites, lactate dehydrogenase level, hemoglobin level, histological transformation, the Italian Lymphoma Inter-group prognostic index for FL and the International Prognostic Index for aggressive lymphomas. In the multivariate analysis bulky disease ( $P = 0.01$ ), presence of B symptoms ( $P = 0.03$ ) and FLIPI at relapse ( $P = 0.0003$ ) were the most important variables for predicting SFP.

**Conclusions:** In patients with FL at first relapse/progression, the FLIPI, along with the presence of bulky disease and B symptoms, are features that predict SFP and thus could be useful to select candidates for experimental treatments.

**Key words:** FLIPI, follicular lymphoma, prognosis, progression

### Introduction

At present, there is no curative treatment for follicular lymphoma (FL). Although most patients with FL have a relatively indolent course with a median survival of about 10 years, the natural history of FL is characterized by a pattern of continuous relapses with a shorter response duration and a shorter survival after each relapse [1–4]. Therefore, new experimental approaches such as stem cell transplantation (SCT) have been developed, especially to treat younger patients, in whom a median survival of 10 years is not acceptable. However, there is great concern regarding the toxicity of these therapies,

including the risk of myelodysplastic syndromes [5–8]. Given the above facts, as well as the responsiveness of the disease at relapse, intensive treatments are usually reserved as salvage therapy for patients in progression. Therefore, the ability to identify patients with poor outcome after the first relapse who might deserve a potentially hazardous approach is important.

Several papers analyzing prognostic factors for FL patients have been published [2, 9–13]. In addition, various attempts to build a prognostic index for these patients have been made [3, 14]. Recently, an international multicenter study including the data from more than 4000 patients resulted in a new prognostic index, the Follicular Lymphoma International Prognostic Index (FLIPI), specifically designed for FL patients [15]. The FLIPI distinguishes three groups of patients with around one-third of cases each, with overall survivals at 10 years of 70%, 50% and 35%.

\*Correspondence to: Dr A. López-Guillermo, Department of Hematology, Hospital Clínic, Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain.  
Tel: +34-93-227-5575; Fax: +34-93-227-5428;  
E-mail: alopezg@clinic.ub.es

In contrast with the many studies dealing with initial prognostic factors in FL after diagnosis, there are few studies addressing the outcome of patients with FL at relapse or progression [4, 16–19]. We hypothesized that the newly developed FLIPI might be useful to identify patients with different prognoses in such a situation. Towards this aim, the potential usefulness of FLIPI in a series of FL patients at first relapse/progression was analyzed.

## Patients and methods

### Initial characteristics and treatment

Two hundred and eighty-four patients (median age 53 years; 143 male, 141 female ratio) diagnosed with FL at two University Hospitals in Barcelona (Spain) between February 1980 and November 2000 were the basis of this study. The histological distribution according to the REAL/WHO classification [20, 21] was as follows: grade I, 102 patients (36%); grade II, 149 patients (52%); grade III, 17 patients (6%); unclassified, 16 patients (6%). Thirty patients (11%) presented with stage I, 24 (8%) with stage II, 52 (18%) with stage III and 178 (63%) with stage IV. Initial treatment consisted of: monotherapy with alkylating agents, 32 patients (11%); COP (cyclophosphamide, vincristine and prednisone) chemotherapy, 18 patients (6%); CHOP (cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine and prednisone) chemotherapy, 202 patients (71%); and other treatments, 32 patients (11%). Among the 266 assessable patients, 124 (47%) achieved a complete response (CR), 112 (42%) a partial response (PR) and 30 patients (11%) were considered as non-responders. After a median follow-up of 4.2 years, 50 of 124 CR patients (40%) and 53 of 112 PR patients (47%) progressed. Overall, the median duration of the response was 1.6 years (range 0.6–14.5). The 103 patients who responded to treatment and eventually progressed were the subject of the present study. The outcome after progression pattern of 75 of these patients has been previously reported [19]. The main characteristics of the patients at diagnosis and at relapse are listed in Table 1.

### Staging, evaluation at response and follow-up procedures

Initial staging procedures included computed tomography (CT) of the thorax, abdomen and pelvis, as well as a bone marrow biopsy. Post-therapy restaging included the repetition of the previously abnormal tests and/or biopsies.

CR was defined as the disappearance of tumor masses and disease-related symptoms, as well as the normalization of the initially abnormal tests and/or biopsies lasting for at least 1 month. PR was considered to be achieved when measurable lesions decreased by at least 50%. Patients not included in these categories, as well as those who died before completing treatment, were considered as non-responders [22].

The follow-up surveillance policy after treatment consisted of physical examination, blood counts and biochemistry, and chest roentgenogram (if initially abnormal) every 3 months during the first year, every 4 months during the second year, every 6 months during the next 3 years and once a year thereafter. Abdominal CT scans were performed every 6 months during the first year and yearly for the following 5 years when abdomen was the principal involved site. The molecular follow-up assessment was only performed systematically from 1998 on.

Disease relapse or progression was defined as the appearance of new symptoms or signs of the disease as demonstrated by lymph node biopsy or other appropriate studies. At the time of relapse or progression, besides a new lymph node biopsy, CT scans of thorax, abdomen and pelvis, as well as a bone marrow biopsy, were performed whenever possible.

**Table 1.** Main characteristics of 103 patients with follicular lymphoma at diagnosis and at relapse

	At diagnosis		At relapse	
	No. assessable	Percent	No. assessable	Percent
Age $\geq 60$ years	103	32	103	48
B symptoms	90	20	95	12
Poor performance status (ECOG $\geq 2$ )	103	13	95	12
Bulky disease ( $\geq 10$ cm)	103	20	93	11
No. of nodal sites $\geq 5$	76	47	76	30
Ann Arbor stage	103		96	
I		8		16
II		11		15
III		13		31
IV		68		38
Hb $< 120$ g/l	85	31	87	27
High serum LDH ( $\geq 450$ IU/l)	88	19	86	21
High serum $\beta 2M$ ( $\geq 3$ mg/L)	43	30	45	31
FLIPI	76		76	
Good prognosis		37		39
Intermediate prognosis		22		24
Poor prognosis		41		37

ECOG, Eastern Cooperative Oncology Group; Hb, hemoglobin; LDH, lactate dehydrogenase;  $\beta 2M$ ,  $\beta_2$ -microglobulin; FLIPI, Follicular Lymphoma International Prognostic Index.

### Parameters evaluated

In each patient the following data were recorded and evaluated for prognosis: (i) Initial variables: age ( $< 60$  versus  $\geq 60$  years), gender, Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) performance status, B symptoms, histological subtype, hemoglobin (Hb), lymphocyte count, serum lactate dehydrogenase (LDH) and serum  $\beta_2$ -microglobulin ( $\beta 2M$ ) levels, number of nodal and extranodal involved sites, Ann Arbor stage, bulky disease (defined as a tumor diameter  $\geq 10$  cm), bone marrow infiltration, the International Prognostic Index (IPI) for aggressive lymphomas and the FLIPI. (ii) Treatment: monotherapy with alkylating agents versus combination chemotherapies without doxorubicin versus doxorubicin-containing regimens. (iii) Response to initial therapy: CR versus PR versus no response. (iv) Response duration (RD): defined as the time from the response assessment to the relapse/progression. (v) Variables at relapse: clinical data (age, performance status, presence of B symptoms), histological subtype (FL versus transformed into high-grade lymphoma), tumor extension data (bulky disease, Ann Arbor stage, number of involved nodal sites, bone marrow involvement, Hb, lymphocyte count, LDH,  $\beta 2M$ ), IPI [23], Italian Lymphoma Intergroup prognostic index (ILI) and FLIPI (as described below). (vi) Salvage treatment and response to salvage treatment.

### Follicular Lymphoma International Prognostic Index

Age  $\geq 60$  years, advanced stage (III–IV), increased serum LDH level, Hb level  $< 120$  g/l and more than five involved nodal sites were the variables used to classify patients according to the FLIPI as patients with good,

intermediate or poor prognosis, depending on the number of adverse prognostic factors (0–1, 2 and  $\geq 3$ , respectively) [15].

### Statistical analysis

Overall survival was defined as the time between the date of diagnosis and the date of last follow-up or death. Survival from progression (SFP) for responding patients (CR or PR) was defined as the time from the relapse or progression assessment to the date of last follow-up or death.

The main end point of the study was SFP. In addition, overall survival was also analyzed. Actuarial survival analysis was performed according to the method described by Kaplan and Meier [24], and the curves were compared by the log-rank test [25]. The univariate analysis was carried out for each of the parameters indicated above. All significant prognostic factors in the univariate study, as well as some clinically relevant variables, were included in a multivariate analysis performed by Cox's stepwise proportional hazard regression method [26].

## Results

### Characteristics of the patients at progression, salvage therapy and response

From March 1983 to May 2002, 103 patients (male 55, female 48) of 236 responders (44%) presented with disease progression or relapse after having achieved CR (50 cases) or PR (53 cases). The median follow-up for surviving patients was 7.2 years (range 2–20.9). A new biopsy at relapse could be obtained in 69 patients (67%) and transformation into a high-grade lymphoma was demonstrated in 11 of them (16%) (diffuse large B-cell lymphoma in all cases). The median age at relapse/progression was 59 years (range 26–78). The main characteristics of the patients are listed in Table 1. Among 96 assessable patients, 67 (70%) were in advanced stage and 11% presented with bulky disease. B symptoms were present in 12% of the patients. A poor performance status (ECOG performance status  $\geq 2$ ) was observed in 11 cases (12%). All the parameters necessary to build up the FLIPI were available in 76 patients. The distribution of the patients according to the FLIPI was as follows: 30 patients, good prognosis (39%);

18 patients, intermediate prognosis (24%); and 28 patients, poor prognosis (37%).

Treatment at progression varied over the study period and consisted of: monotherapy with alkylating agents, 23 patients (22%); combination chemotherapy (including doxorubicin in 16 cases and ifosfamide/etoposide-containing regimens in 24 cases), 47 patients (46%); purine analogs alone or in combination, 18 patients (17%); and other treatments, 15 patients (15%). Among the latter, three patients were observed without treatment until further progression and four patients in localized stage received radiotherapy as salvage therapy. Treatment at progression for transformed patients consisted of combination chemotherapy including doxorubicin in three cases and ifosfamide/etoposide-containing regimens in eight cases. Autologous SCT was performed in 22 patients at first relapse as part of the salvage treatment because of the following reasons: RD  $< 2$  years in 17 patients; disease transformation in six; and both causes in three. Seventeen of 58 (29%) patients with an RD  $< 2$  years were submitted to SCT at first relapse, whereas this proportion was 12% in those cases with a RD  $\geq 2$  years ( $P=0.03$ ). SCT was performed at first relapse as part of the salvage therapy in 30%, 39% and 14% of patients with good, intermediate and poor prognosis according to the FLIPI, respectively ( $P$  not significant). One patient received an allogeneic SCT with reduced-intensity conditioning.

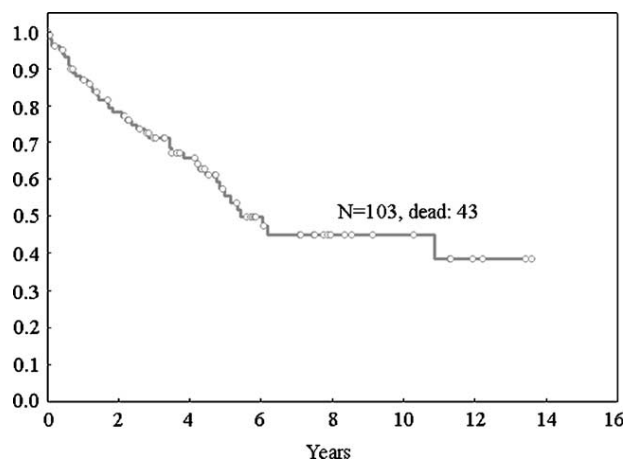
Forty-three of 93 assessable patients achieved CR (46%) after salvage therapy, 31 (33%) achieved PR and 19 patients (21%) were considered as non-responders.

### Survival from progression

The median SFP was 5.4 years, with a 5-year SFP of 55% [95% confidence interval (CI) 44% to 66%] (Figure 1). The most important variables predicting SFP are listed in Table 2. First-line treatment (monotherapy with alkylating agents versus combination chemotherapies without doxorubicin versus doxorubicin-containing regimens) did not significantly correlate with SFP. No statistical differences in SFP were found between patients achieving CR after initial therapy and patients in PR.

Prognostic factors at progression with a negative impact on SFP were: older age, poor performance status, presence of B symptoms, transformation into an aggressive lymphoma, anemia (Hb  $< 120$  g/l), high LDH level, number of involved nodal sites, bulky disease, poor prognosis according to the ILI as well as intermediate- or high-risk IPI. The FLIPI also showed an important predictive value for SFP: 5-year SFP for patients with good, intermediate and poor prognosis according to the FLIPI were 85% (95% CI 75% to 95%), 79% (95% CI 60% to 99%) and 28% (95% CI 8% to 48%), respectively ( $P < 0.0001$ ) (Figure 2).

SFP was not significantly influenced by the duration of the first response, with the median survival for patients with RD  $< 2$  and  $\geq 2$  years being 4.9 and 6 years, respectively. Finally, the achievement of CR or PR after salvage treatment was



**Figure 1.** Survival from progression (SFP) in 103 responder patients who eventually progressed. Five-year SFP: 55% (95% confidence interval 44% to 66%).



**Table 2.** Prognostic factors for SFP in 103 patients with follicular lymphoma who presented with relapse (all the variables are considered at relapse): results of univariate analysis

Variable	No. of patients	% dead	5-year SFP	P
<b>Initial response</b>				
CR	50	42	50	NS
PR	53	41	60	
<b>Response duration</b>				
<2 years	58	40	50	NS
≥2 years	45	44	58	
<b>Age</b>				
<60 years	54	33	65	0.04
≥60 years	49	51	44	
<b>B symptoms</b>				
No	84	34	61	0.01
Yes	11	73	30	
<b>ECOG performance status</b>				
0–1	84	33	61	<0.0001
≥2	11	91	18	
<b>Transformation<sup>a</sup></b>				
No	58	26	71	0.005
Yes	11	73	40	
<b>No. of nodal involved sites</b>				
<5	53	24	75	0.02
≥5	23	52	45	
<b>Bulky disease (≥10 cm)</b>				
No	83	34	63	0.0009
Yes	10	80	15	
<b>BM involvement</b>				
No	36	28	73	NS
Yes	24	42	34	
<b>Ann Arbor stage</b>				
I–II	29	34	76	NS
III–IV	67	42	45	
<b>Hb</b>				
<120 g/l	23	61	30	0.002
≥120 g/l	64	30	67	
<b>Serum LDH level</b>				
<450 IU/l	68	29	66	0.001
≥450 IU/l	18	67	33	
<b>IPI</b>				
Low risk	55	24	78	<0.0001
Intermediate or high risk	40	63	28	
<b>ILI</b>				
Low risk	40	17	84	0.0001
Intermediate risk	13	54	38	
High risk	17	71	27	

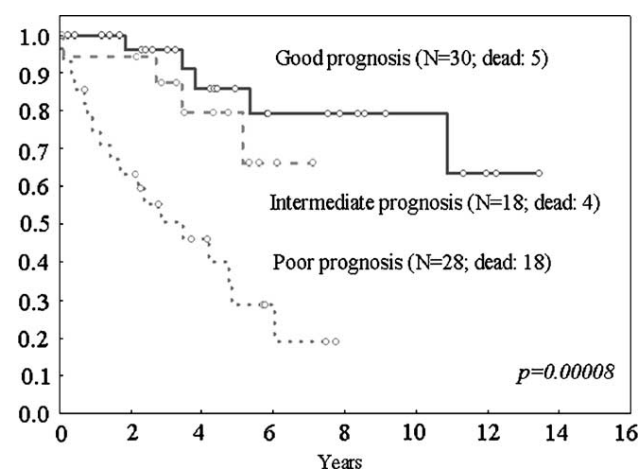
**Table 2.** (Continued)

Variable	No. of patients	% dead	5-year SFP	P
<b>FLIPI</b>				
Good prognosis	30	17	85	<0.0001
Intermediate prognosis	18	22	79	
Poor prognosis	28	64	28	
<b>Response to salvage therapy</b>				
CR	43	35	68	<0.0001
PR	31	32	63	
NR	19	79	0	

<sup>a</sup>Only those cases assessed by a tissue biopsy were included. SFP, survival from progression; NS, not significant; CR, complete response; PR, partial response; ECOG, Eastern Cooperative Oncology Group; BM, bone marrow; Hb, hemoglobin; LDH, lactate dehydrogenase; IPI, International Prognostic Index for aggressive lymphomas; ILI, Italian Lymphoma Intergroup prognostic index; FLIPI, Follicular Lymphoma International Prognostic Index; NR, non-responder.

significantly associated with a longer SFP (median SFP 10.8 versus 0.7 years for non-responders;  $P < 0.00001$ ).

To assess the importance of the FLIPI in predicting SFP, a multivariate analysis was performed. Besides the FLIPI (good versus intermediate versus poor prognosis) the variables selected for the analysis were as follows: (i) variables with prognostic significance in the univariate analysis ( $P < 0.05$ ) and a high enough number of assessable cases: B symptoms at relapse (no versus yes), bulky disease at relapse (no versus yes), transformation into a high-risk lymphoma (no transformation versus transformation versus no biopsy); and (ii) RD (<2 versus ≥2 years). The variables used to calculate the FLIPI were not included in the model. Seventy-four of the 103 study patients were included in the final multivariate analysis for SFP. The variables that retained prognostic significance for

**Figure 2.** Survival from progression (SFP) according to the Follicular Lymphoma International Prognostic Index (FLIPI). Five-year SFP: 85% [95% confidence interval (CI) 75% to 95%], 79% (95% CI 60% to 99%) and 28% (95% CI 8% to 48%) for patients with good, intermediate and poor prognosis, respectively.

**Table 3.** Survival from progression according to the FLIPI, the ILI and the IPI

FLIPI ( <i>n</i> =76)			ILI ( <i>n</i> =70)			IPI ( <i>n</i> =95)		
	%	5-year SFP		%	5-year SFP		%	5-year SFP
Good prognosis (0, 1)	39	85	Low risk (0, 1)	57	84	Low risk (0, 1)	58	78
Intermediate prognosis (2)	24	79	Intermediate risk (2)	19	38	Low/intermediate risk (2)	23	36
Poor prognosis (3, 4, 5)	37	28	High risk (3, 4, 5)	24	27	High/intermediate (3)	13	10
						High risk (4, 5)	6	33

Number of risk factors given in parentheses.

FLIPI, Follicular Lymphoma International Prognostic Index; ILI, Italian Lymphoma Intergroup prognostic index; IPI, International Prognostic Index for aggressive lymphomas; SFP, survival from progression.

SFP were the presence of bulky disease at progression [ $P=0.005$ ; relative risk (RR) 3.8; 95% CI 2.9–4.8], the presence of B symptoms at relapse ( $P=0.03$ ; RR 2.7; 95% CI 1.8–3.6) and the FLIPI at progression ( $P=0.002$ ; RR 2.4; 95% CI 1.9–3). The multivariate analysis was repeated including only the patients in whom a new biopsy was performed at relapse to better analyze the role of histological transformation. In this subset of patients, the variables with prognostic significance for SFP were the presence of B symptoms, histological transformation and the FLIPI.

In Table 3, 5-year SFP according to the FLIPI, the ILI and the IPI is detailed. FLIPI, ILI (low versus intermediate versus high risk) and IPI (0, 1 versus  $\geq 2$  risk factors) were compared by a Cox regression method including these three scores as covariates. In the final model, with 61 cases, the FLIPI retained prognostic importance for SFP ( $P=0.0001$ ; RR 2.9; 95% CI 2.4–3.4).

## Discussion

FL remains incurable with current therapies. For this reason, there is a great interest in investigating the role of new treatment approaches such as monoclonal antibodies (mAbs) or autologous SCT in patients with FL. Regarding intensive regimens, patients receiving high-dose chemotherapy with autologous SCT presented a longer time to treatment failure in comparison with historical controls in two studies [27, 28], although only one of them showed modest advantage in survival [28]. Nevertheless, the early toxicity with autologous SCT is not negligible, with a mortality rate of 5% to 10% [28–30]. On the other hand, long-term toxicity is of concern, specially regarding myelodysplastic syndromes, reported in up to 12% of cases [5–8]. The long-term toxicity of other treatment modalities such as radiolabeled mAbs is not yet known. Because of this, newer and experimental therapies in FL are usually reserved for patients with unfavorable prognostic features either at diagnosis or at relapse.

The analysis of prognostic factors in patients with FL upon relapse or progression has been addressed in a few studies. Age at relapse [4, 16], response to first-line therapy [16], number of previous lines of therapy [4], response to salvage treatment [17] and RD [16, 19] are factors that have been associated with survival from first progression. However, the

prognostic significance of clinical features at relapse has not been fully investigated. Spinolo et al. [18] reported that the number of prior failures, as well as B symptoms, Hb level and number of extranodal sites at relapse, were associated with outcome after progression, but in this study survival was analyzed after several relapses.

In the present series, poor prognosis according to the FLIPI, as well as the presence of bulky disease and B symptoms, were the factors at relapse that allowed the discrimination of patients with a shorter survival from progression. In line with some other studies [4, 16], in the current series the 5-year SFP was significantly shorter in older patients in the univariate analysis, but this variable was not included in the multivariate analysis since it is incorporated in the FLIPI. The prognostic value of the presence of bulky disease is consistent with the findings from a previous study by our group [19]. In the present series, the 5-year SFP of patients with good, intermediate or poor prognosis according to the FLIPI was 85%, 79% and 28%, respectively ( $P<0.0001$ ). In the multivariate analysis the FLIPI emerged as one of the variables with prognostic value for SFP. Of note, the RD was also included in the multivariate analysis and did not achieve prognostic importance. Moreover, when we compared the FLIPI, the ILI and the IPI by a Cox regression, only the FLIPI retained prognostic significance. These results support the predictive value for SFP of FLIPI at relapse, and suggest that this index may be more accurate than other scores to select FL patients according to their risk.

In contrast to the report by Weisdorf et al. [16], response to first-line therapy did not predict SFP in the present series. RD, another variable with important prognostic value for SFP in the Weisdorf et al. [16] paper, did not correlate with survival in the current study. In fact, although in a previous report from our group [19] RD maintained its prognostic value for SFP, in the current series the median SFP was 4.9 and 6 years for patients with RD  $<2$  and  $\geq 2$  years, respectively. Since, according to our previous results, patients with RD  $<2$  years were submitted to autologous SCT, this may have overcome the negative impact of a shorter initial response on overall survival (data not shown).

In conclusion, this study shows that the clinical characteristics of the disease at relapse as assessed by the FLIPI are the crucial factor in the outcome of patients with FL after

progression. Consequently, FLIPI may be employed to identify patients in progression who have an especially unfavorable outcome, who, because of this, are reasonable candidates for experimental therapies.

## Acknowledgements

This work was supported in part by grants 02/0250 and 03/0473 from the Fondo de Investigación Sanitaria, Spanish Ministry of Health, Spain, and the Generalitat de Catalunya (2002XT 00030).

## References

1. Horning SJ, Rosenberg SA. The natural history of initially untreated low-grade non-Hodgkin's lymphomas. *N Engl J Med* 1984; 311: 1471–1475.
2. Gallagher CJ, Gregory WM, Jones AE et al. Follicular lymphoma: prognostic factors for response and survival. *J Clin Oncol* 1986; 4: 1470–1480.
3. Romaguera JE, McLaughlin P, North L et al. Multivariate analysis of prognostic factors in stage IV follicular low-grade lymphoma: a risk model. *J Clin Oncol* 1991; 9: 762–769.
4. Johnson PW, Rohatiner AZ, Whelan JS et al. Patterns of survival in patients with recurrent follicular lymphoma: a 20-year study from a single center. *J Clin Oncol* 1995; 13: 140–147.
5. Friedberg JW, Neuberg D, Stone RM et al. Outcome in patients with myelodysplastic syndrome after autologous bone marrow transplantation for non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 1999; 17: 3128–3135.
6. Micallef IN, Lillington DM, Apostolidis J et al. Therapy-related myelodysplasia and secondary acute myelogenous leukemia after high-dose therapy with autologous hematopoietic progenitor-cell support for lymphoid malignancies. *J Clin Oncol* 2000; 18: 947–955.
7. Hosang C, Munsell M, Yazji S et al. Risk of therapy-related myelodysplastic syndrome/acute leukemia following high-dose therapy and autologous bone marrow transplantation for non-Hodgkin's lymphoma. *Ann Oncol* 2002; 13: 450–459.
8. Metayer C, Curtis RE, Vose J et al. Myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia after autotransplantation for lymphoma: a multicenter case-control study. *Blood* 2003; 101: 2015–2023.
9. Cabanillas F, Smith T, Bodey GP et al. Nodular malignant lymphomas: factors affecting complete response rate and survival. *Cancer* 1979; 44: 1983–1989.
10. Cameron DA, Leonard RC, Mao JH, Prescott RJ. Identification of prognostic groups in follicular lymphoma The Scotland and Newcastle Lymphoma Group Therapy Working Party. *Leuk Lymphoma* 1993; 10: 89–99.
11. Litam P, Swan F, Cabanillas F et al. Prognostic value of serum beta-2 microglobulin in low-grade lymphoma. *Ann Intern Med* 1991; 114: 855–860.
12. Soubeyran P, Eghbali H, Bonichon F et al. Low-grade follicular lymphomas: analysis of prognosis in a series of 281 patients. *Eur J Cancer* 1991; 27: 1606–1613.
13. Leonard RC, Hayward RL, Prescott RJ, Wang JX. The identification of discrete prognostic groups in low grade non-Hodgkin's lymphoma The Scotland and Newcastle Lymphoma Group Therapy Working Party. *Ann Oncol* 1991; 2: 655–662.
14. Federico M, Vitolo U, Zinzani PL et al. Prognosis of follicular lymphoma: a predictive model based on a retrospective analysis of 987 cases Intergruppo Italiano Linfomi. *Blood* 2000; 95: 783–789.
15. Solal-Céligny PH, Roy P. Follicular lymphoma international prognostic project (FLIPP). *Blood* 2004; In press.
16. Weisdorf DJ, Andersen JW, Glick JH, Oken MM. Survival after relapse of low-grade non-Hodgkin's lymphoma: implications for marrow transplantation. *J Clin Oncol* 1992; 10: 942–947.
17. Davidge-Pitts M, Dansey R, Bezwoda WR. Salvage treatment after failure or relapse following initial chemotherapy for follicular non-Hodgkin's lymphoma. *Leuk Lymphoma* 1997; 24: 341–347.
18. Spinolo JA, Cabanillas F, Dixon DO et al. Therapy of relapsed or refractory low-grade follicular lymphomas: factors associated with complete remission, survival and time to treatment failure. *Ann Oncol* 1992; 3: 227–232.
19. Montoto S, López-Guillermo A, Ferrer A et al. Survival after progression in patients with follicular lymphoma: analysis of prognostic factors. *Ann Oncol* 2002; 13: 523–530.
20. Harris NL, Jaffe ES, Stein H et al. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood* 1994; 84: 1361–1392.
21. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J et al. The World Health Organization classification of neoplasms of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting—Airlie House Virginia, November, 1997. *Hematol J* 2000; 1: 53–66.
22. Cheson BD, Horning SJ, Coiffier B et al. Report of an international workshop to standardize response criteria for non-Hodgkin's lymphomas. NCI Sponsored International Working Group. *J Clin Oncol* 1999; 17: 1244–1253.
23. A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project. *N Engl J Med* 1993; 329: 987–994.
24. Kaplan EL, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc* 1958; 53: 457–481.
25. Peto R, Pike MC. Conservatism of the approximation  $\Sigma (O-E)^2/E$  in the log-rank test for survival data on tumour incidence data. *Biometrics* 1973; 29: 759–784.
26. Cox DR. Regression models and life tables. *J R Stat Assoc* 1972; 34: 187–220.
27. Apostolidis J, Gupta RK, Grenzelias D et al. High-dose therapy with autologous bone marrow support as consolidation of remission in follicular lymphoma: long-term clinical and molecular follow-up. *J Clin Oncol* 2000; 18: 527–536.
28. Brice P, Simon D, Bouabdallah R et al. High-dose therapy with autologous stem-cell transplantation (ASCT) after first progression prolonged survival of follicular lymphoma patients included in the prospective GELF 86 protocol. *Ann Oncol* 2000; 11: 1585–1590.
29. Stein RS, Greer JP, Goodman S et al. High-dose therapy with autologous or allogeneic transplantation as salvage therapy for small cleaved cell lymphoma of follicular center cell origin. *Bone Marrow Transplant* 1999; 23: 227–233.
30. Bierman PJ, Vose JM, Anderson JR et al. High-dose therapy with autologous hematopoietic rescue for follicular low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 1997; 15: 445–450.

## *V. DISCUSIÓN*

La primera parte de esta tesis se dedicó al estudio del valor pronóstico del reordenamiento *BCL2/IgH* en el momento del diagnóstico y su posible asociación con otras características clínicas. La detección del reordenamiento *BCL2/IgH* en el 67% de los pacientes (Capítulo 4.1) es similar a los resultados publicados en otros centros europeos, cuando se analiza la existencia de dicho reordenamiento mediante *Southern blot* o PCR convencional (110,111,177). Por el contrario, en la mayoría de series americanas este porcentaje es mayor, mientras que se detecta un porcentaje menor de pacientes con el reordenamiento en diversos estudios japoneses (8,18,107). Por lo que hace referencia a la distribución según el punto de ruptura en *BCL-2*, en la presente serie se detectó un porcentaje menor de pacientes con reordenamiento en *mcr* que en otras series publicadas (107,177). La presencia del reordenamiento de *BCL-2* no se asoció a ninguna de las variables clínicas estudiadas en nuestra serie, exceptuando la edad. Así, entre los pacientes mayores se detectó una menor frecuencia de dicho reordenamiento que en pacientes más jóvenes. Se han publicado resultados similares en el subgrupo de pacientes con LF “de bajo grado” (108). Por el contrario, en varios estudios se ha observado que la incidencia del reordenamiento *BCL-2/IgH* en individuos sanos aumenta con la edad (31,32). De hecho, se ha relacionado el aumento de la incidencia del reordenamiento al aumentar la edad con la mayor incidencia de LF en pacientes mayores. Por lo que hace referencia a la falta de relación entre el reordenamiento de *BCL-2* y otras características clínicas en el estudio que conforma el primer trabajo de esta tesis, la serie de Bertoni et al. confirma estos resultados (111). En cuanto al análisis de las características clínicas según el punto de ruptura en el oncogén *BCL-2*, son escasos los artículos en que se analiza este aspecto. Así, en la serie del M.D. Anderson Cancer Center los pacientes con reordenamiento en el punto de ruptura *mcr* presentan con más frecuencia estadios localizados al diagnóstico, así como una  $\beta$ 2microglobulina

normal, que los pacientes con reordenamiento en *MBR* o aquellos sin reordenamiento (107), mientras que en la de Buchonnet et al. no se halla ninguna relación entre las características de los pacientes al diagnóstico y ninguno de los puntos de ruptura estudiados (12). El escaso número de pacientes con reordenamiento en *mcr* impidió el análisis de las características clínicas según el punto de ruptura en el primer trabajo que configura esta tesis. Dicho trabajo se completó con el estudio del valor pronóstico del reordenamiento *BCL-2/IgH*. La existencia de dicho reordenamiento no se asoció con la evolución clínica de los pacientes, ni en cuanto a la tasa de respuestas, ni en cuanto a la supervivencia libre de progresión o a la supervivencia global. Aunque los resultados publicados en la literatura a este respecto son contradictorios, estos datos son concordantes con los publicados por Pezella et al. y Bertoni et al. (110,111). Una importante limitación a la hora de comparar los resultados de nuestro estudio con otros viene dada por las grandes diferencias en las técnicas empleadas, lo que se demuestra al comparar los resultados del análisis de las mismas muestras obtenidos en diferentes laboratorios internacionales (118). En los últimos años se ha extendido el uso de la PCR a tiempo real (*real-time PCR*) para el estudio del reordenamiento de *BCL-2*; dicha técnica permite la cuantificación del reordenamiento y, aparentemente, es más reproducible que la PCR convencional (130). Así, la presencia del reordenamiento *BCL-2/IgH* en *MBR* detectado por PCR *real-time* no se asocia a ninguna característica clínica determinada ni influye en la supervivencia global de los pacientes (217), en línea con los resultados obtenidos en el primer trabajo de esta tesis. En nuestra serie se analizaron indistintamente muestras de ADN obtenidas a partir de sangre periférica, médula ósea o ganglio. El tipo de muestra analizado, otra potencial fuente de discrepancias entre diferentes series, no parece influir en los resultados, puesto que en varios estudios se ha demostrado una estrecha correlación entre los datos obtenidos al analizar sangre

periférica y médula ósea (107,177). Por último, cabe mencionar la posibilidad de que en nuestra serie la ausencia de detección del reordenamiento *BCL-2/IgH* en otros puntos de ruptura distintos de los clásicos *MBR* y *mcr*, debido a limitaciones propias de la técnica empleada, influyera en los resultados. Sin embargo, en la serie de Buchonnet et al. en que se detecta el reordenamiento *BCL-2/IgH* en el 92% de los pacientes gracias al análisis de puntos de ruptura adicionales, tampoco se observa una correlación entre la presencia o no del reordenamiento y las características clínicas o el pronóstico de los pacientes (12).

La segunda parte de la presente tesis se centró en el análisis de las variables clínicas que pudieran facilitar la identificación de aquellos pacientes con LF en primera recaída que por su mal pronóstico fueran tributarios de ser sometidos a tratamientos experimentales. Mientras que son numerosos los trabajos acerca de factores pronósticos en pacientes con LF en el momento del diagnóstico (50,83-87,89), el pronóstico de los pacientes con LF en progresión ha sido menos estudiado y, con frecuencia, son escasos los datos acerca de las características clínicas de los pacientes en el momento de la recaída. En la serie en que se analizaron los factores pronósticos para la supervivencia desde la progresión (Capítulo 4.2) diversas características clínicas de los pacientes en el momento de la recaída se asociaron a una supervivencia acortada, siendo el estado general y la duración de la respuesta las variables que mantuvieron el valor pronóstico para la supervivencia desde la progresión en el análisis multivariado. En el subgrupo de pacientes menores de 60 años, dichas variables, junto con la existencia de enfermedad voluminosa, mostraron valor pronóstico para la SDP. Estos resultados son difícilmente comparables con los de otras series similares por la heterogeneidad de estos estudios, puesto que, mientras que en algunos únicamente se incluyen pacientes en primera recaída (65,100,101), en otros se analiza el pronóstico de los pacientes tras haber

experimentado sucesivas recaídas (99). La importancia pronóstica del estado general o de la enfermedad voluminosa en pacientes jóvenes no ha sido descrita con anterioridad. Sin embargo, tal como se ha mencionado previamente, el valor pronóstico de las características clínicas de los pacientes en el momento de la recaída no se ha estudiado con profundidad en ninguna de las series en que se analiza la supervivencia desde la progresión, exceptuando en la serie de Spinolo et al. En este trabajo, en que se estudian los factores que influyen en la supervivencia desde la progresión en pacientes con LF que han experimentado una o más recaídas, la presencia de síntomas B en la progresión, así como el número de áreas extraganglionares afectas o una cifra de hemoglobina inferior a 12 g/L se asocian a una supervivencia desde la progresión acortada, mientras que otras características en la recaída tales como el estadio, el nivel sérico de LDH, el recuento de plaquetas o la infiltración de médula ósea, bazo o mediastino no influyen en el porvenir de estos pacientes (99). En contraste con este estudio, entre las series que analizan el pronóstico de los pacientes con LF tras la primera recaída las únicas variables clínicas estudiadas en la progresión son la edad, el lugar de progresión y la histología en la recaída (65,100). En estas series, la edad aparece como un importante factor pronóstico para la SDP. Otras variables no relacionadas con las manifestaciones clínicas en la recaída que influyen en la supervivencia desde la progresión son el número de líneas terapéuticas administradas (ya sea para alcanzar una primera respuesta (65) o por la existencia de múltiples recaídas (99)), la respuesta al tratamiento de primera línea y la duración de la respuesta (100). En la presente serie, la duración de la respuesta inferior a 2 años se asoció a una supervivencia desde la progresión acortada (SDP a los 5 años: 33% frente a 63% en pacientes con una duración de la respuesta superior), mientras que la respuesta al tratamiento de primera línea (respuesta completa frente a respuesta parcial) no influyó en la SDP. Por el contrario, en la serie de Weisdorf



et al. los pacientes que alcanzan una respuesta parcial presentan un pronóstico desfavorable en comparación con los pacientes en respuesta completa; sin embargo, cuando la duración de la respuesta inicial es inferior a un año el pronóstico es sumamente desfavorable, independientemente de que la respuesta inicial alcanzada haya sido completa o parcial (100). Estos datos apoyan la importancia de la duración de la respuesta en el porvenir de los pacientes con LF en recaída, como sugieren los resultados del segundo trabajo de esta tesis.

El estudio de los factores pronósticos en la recaída se completó con el análisis del valor pronóstico en la progresión del *Follicular Lymphoma International Prognostic Index* (FLIPI) (Capítulo 4.3). A diferencia de lo ocurrido con el IPI, el índice pronóstico para linfomas agresivos, convertido en la principal herramienta pronóstica en este tipo de linfomas, hasta la fecha no se ha descrito ningún índice pronóstico para pacientes con linfomas indolentes que haya sido ampliamente aceptado y aplicado. Se han propuesto varios índices para linfomas foliculares (47,50), algunos ellos diseñados a partir del estudio de un número considerable de pacientes, sin que ninguno de ellos se haya constituido en un índice de referencia para esta población debido, básicamente, a dificultades en su aplicación práctica. Por otra parte, alguno de estos índices comparte el principal inconveniente del IPI cuando se aplica en pacientes con linfomas indolentes: únicamente un pequeño porcentaje de enfermos queda incluido en el grupo de alto riesgo (51,87). En este contexto se llevó a cabo el estudio multicéntrico internacional que dio lugar al FLIPI, tras el análisis de los datos de más de 4000 pacientes con LF y un seguimiento mínimo de 5 años (96). Este índice permite clasificar a los pacientes con LF en tres grupos de riesgo bajo, intermedio o alto, con un porcentaje de pacientes incluidos en cada uno bastante similar y con un pronóstico claramente diferenciado. Así pues, el FLIPI se perfila como el equivalente del IPI para linfomas indolentes, aunque

para ello se debe demostrar su aplicabilidad en la práctica clínica y su validez en estudios prospectivos. El objetivo del tercer trabajo que configura esta tesis fue analizar el valor pronóstico del FLIPI en pacientes en recaída. En nuestra serie el 39% de los pacientes quedó incluido en el grupo de bajo riesgo según el FLIPI en el momento de la recaída, mientras que los grupos de riesgo intermedio y alto incluyeron el 24 y 37% de los pacientes, respectivamente. Es decir, el FLIPI es capaz de clasificar a los pacientes en grupos relativamente equilibrados en cuanto al porcentaje de pacientes en cada uno también en el momento de la recaída. Estos 3 grupos de riesgo presentaron una supervivencia desde la progresión claramente diferenciada (SDP a los 5 años: 85, 79 y 28%, respectivamente). En el análisis multivariado el FLIPI retuvo el valor pronóstico para la SDP junto con la existencia de enfermedad voluminosa y la presencia de síntomas B en la recaída. Por otra parte, en la comparación del FLIPI con el ILI y el IPI el único índice que mantuvo su valor pronóstico para la supervivencia desde la progresión fue el FLIPI. Cabe mencionar que la duración de la respuesta, una importante variable con valor pronóstico para la supervivencia desde la progresión en el análisis previo, no se correlacionó con la supervivencia en el último trabajo de esta tesis. Ello podría ser debido a un cambio en la estrategia terapéutica según los resultados obtenidos previamente, puesto que, a raíz de ellos, los pacientes cuya respuesta al tratamiento inicial había sido inferior a 2 años fueron sometidos a un trasplante autólogo de progenitores hemopoyéticos dado su mal pronóstico. Es posible que el tratamiento intensivo contrarrestara el efecto negativo de la duración de la respuesta, perdiendo ésta su valor pronóstico en el tercer trabajo que conforma esta tesis. Los datos de este estudio corroboran los del trabajo anterior en cuanto a la importancia pronóstica de la forma de presentación clínica en la recaída, de forma que los pacientes con unas características clínicas agresivas (por ej. mal estado general, presencia de síntomas B o

enfermedad voluminosa) presentaron un pronóstico más desfavorable que el resto. Por último, los datos de este estudio avalan la utilidad del FLIPI como herramienta pronóstica para seleccionar pacientes cuyo mal pronóstico los convierte en candidatos a recibir tratamientos experimentales.

## ***VI. CONCLUSIONES***

***Estudio del reordenamiento BCL-2/IgH***

1. En el 67% de los pacientes con linfoma folicular es posible la detección del reordenamiento de *BCL-2* mediante PCR convencional.
2. El reordenamiento *BCL-2/IgH* no se asocia a ninguna de las características clínicas analizadas, exceptuando una menor edad.
3. La presencia del reordenamiento del oncogén *BCL-2* no influye significativamente en el pronóstico de los pacientes con linfoma folicular, ni en cuanto a la tasa de respuestas, ni en cuanto a la supervivencia global o a la supervivencia libre de progresión.

***Factores pronósticos para la supervivencia desde la progresión***

4. Alrededor de la mitad de los pacientes con linfoma folicular están vivos a los 5 años tras la primera progresión.
5. La mediana de duración de la primera respuesta en pacientes con linfoma folicular es aproximadamente de 2 años.
6. Los pacientes con una duración de la primera respuesta inferior a 2 años presentan un pronóstico desfavorable, con una supervivencia desde la progresión inferior a la de los pacientes con una duración de la respuesta más prolongada.
7. La presencia de características clínicas agresivas en la recaída, tales como el mal estado general o la existencia de enfermedad voluminosa o de síntomas B, permite identificar aquellos pacientes con un pronóstico más desfavorable.

***Valor pronóstico del FLIPI en la recaída***

8. Según el FLIPI en el momento de la recaída, el 39% de los pacientes pertenece al grupo de buen pronóstico, el 24% presenta un pronóstico intermedio, mientras que el 37% restante de los pacientes tiene un pronóstico desfavorable.
9. La supervivencia desde la progresión a los 5 años para los pacientes pertenecientes a los grupos de buen, intermedio o mal pronóstico según el FLIPI es 85%, 79% y 28%, respectivamente.
10. La clasificación de los pacientes en el momento de la recaída según el FLIPI permite la discriminación de los pacientes que presentan un especial mal pronóstico.

## ***VII. BIBLIOGRAFÍA***

1. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J, et al. The World Health Organization classification of neoplasms of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting--Airlie House, Virginia, November, 1997. *Hematol J* 2000; 1:53-66.
2. National Cancer Institute sponsored study of classifications of non-Hodgkin's lymphomas: summary and description of a working formulation for clinical usage. The Non-Hodgkin's Lymphoma Pathologic Classification Project. *Cancer* 1982; 49:2112-35.
3. Warnke RA, Armed Forces Institute of Pathology, American Registry of Pathology, Universities Associated for Research and Education in Pathology. *Tumors of the lymph nodes and spleen*. 1995.
4. Pezzella F, Tse AG, Cordell JL, Pulford KA, Gatter KC, Mason DY. Expression of the bcl-2 oncogene protein is not specific for the 14;18 chromosomal translocation. *Am J Pathol* 1990; 137:225-32.
5. Zutter M, Hockenbery D, Silverman GA, Korsmeyer SJ. Immunolocalization of the Bcl-2 protein within hematopoietic neoplasms. *Blood* 1991; 78:1062-8.
6. Pileri SA, Ascani S, Sabattini E, Fraternali-Orcioni G, Poggi S, Piccioli M, et al. The pathologist's view point. Part I--indolent lymphomas. *Haematologica* 2000; 85:1291-307.
7. Yunis JJ, Frizzera G, Oken MM, McKenna J, Theologides A, Arnesen M. Multiple recurrent genomic defects in follicular lymphoma. A possible model for cancer. *N Engl J Med* 1987; 316:79-84.
8. Horsman DE, Gascoyne RD, Coupland RW, Coldman AJ, Adomat SA. Comparison of cytogenetic analysis, southern analysis, and polymerase chain reaction for the detection of t(14; 18) in follicular lymphoma. *Am J Clin Pathol* 1995; 103:472-8.
9. Cleary ML, Sklar J. Nucleotide sequence of a t(14;18) chromosomal breakpoint in follicular lymphoma and demonstration of a breakpoint-cluster region near a transcriptionally active locus on chromosome 18. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985; 82:7439-43.
10. Cleary ML, Galili N, Sklar J. Detection of a second t(14;18) breakpoint cluster region in human follicular lymphomas. *J Exp Med* 1986; 164:315-20.
11. Albinger-Hegy A, Hochreutener B, Abdou MT, Hegyi I, Dours-Zimmermann MT, Kurrer MO, et al. High frequency of t(14;18)-translocation breakpoints outside of major breakpoint and minor cluster regions in follicular lymphomas: improved polymerase chain reaction protocols for their detection. *Am J Pathol* 2002; 160:823-32.
12. Buchonnet G, Jardin F, Jean N, Bertrand P, Parmentier F, Tison S, et al. Distribution of BCL2 breakpoints in follicular lymphoma and correlation with clinical features: specific subtypes or same disease? *Leukemia* 2002; 16:1852-6.



13. Akasaka T, Akasaka H, Yonetani N, Ohno H, Yamabe H, Fukuhara S, et al. Refinement of the BCL2/immunoglobulin heavy chain fusion gene in t(14;18)(q32;q21) by polymerase chain reaction amplification for long targets. *Genes Chromosomes Cancer* 1998; 21:17-29.
14. Vaandrager JW, Schuurin E, Raap T, Philippo K, Kleiverda K, Kluin P. Interphase FISH detection of BCL2 rearrangement in follicular lymphoma using breakpoint-flanking probes. *Genes Chromosomes Cancer* 2000; 27:85-94.
15. Salar A, Fernandez dS, Romagosa V, Domingo-Claros A, Gonzalez-Barca E, de Sanjose S, et al. Distribution and incidence rates of lymphoid neoplasms according to the REAL classification in a single institution. A prospective study of 940 cases. *Eur J Haematol* 1997; 59:231-7.
16. Anderson JR, Armitage JO, Weisenburger DD. Epidemiology of the non-Hodgkin's lymphomas: distributions of the major subtypes differ by geographic locations. Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *Ann Oncol* 1998; 9:717-20.
17. Herrinton LJ, Goldoft M, Schwartz SM, Weiss NS. The incidence of non-Hodgkin's lymphoma and its histologic subtypes in Asian migrants to the United States and their descendants. *Cancer Causes Control* 1996; 7:224-30.
18. Biagi JJ, Seymour JF. Insights into the molecular pathogenesis of follicular lymphoma arising from analysis of geographic variation. *Blood* 2002; 99:4265-75.
19. Liu YJ, Mason DY, Johnson GD, Abbot S, Gregory CD, Hardie DL, et al. Germinal center cells express bcl-2 protein after activation by signals which prevent their entry into apoptosis. *Eur J Immunol* 1991; 21:1905-10.
20. Kuppers R, Klein U, Hansmann ML, Rajewsky K. Cellular origin of human B-cell lymphomas. *N Engl J Med* 1999; 341:1520-9.
21. Cleary ML, Meeker TC, Levy S, Lee E, Trela M, Sklar J, et al. Clustering of extensive somatic mutations in the variable region of an immunoglobulin heavy chain gene from a human B cell lymphoma. *Cell* 1986; 44:97-106.
22. Bahler DW, Campbell MJ, Hart S, Miller RA, Levy S, Levy R. Ig VH gene expression among human follicular lymphomas. *Blood* 1991; 78:1561-8.
23. Bakhshi A, Jensen JP, Goldman P, Wright JJ, McBride OW, Epstein AL, et al. Cloning the chromosomal breakpoint of t(14;18) human lymphomas: clustering around JH on chromosome 14 and near a transcriptional unit on 18. *Cell* 1985; 41:899-906.
24. Cleary ML, Smith SD, Sklar J. Cloning and structural analysis of cDNAs for bcl-2 and a hybrid bcl-2/immunoglobulin transcript resulting from the t(14;18) translocation. *Cell* 1986; 47:19-28.
25. Cory S. Regulation of lymphocyte survival by the bcl-2 gene family. *Annu Rev Immunol* 1995; 13:513-43.

26. Yang E, Korsmeyer SJ. Molecular thanatopsis: a discourse on the BCL2 family and cell death. *Blood* 1996; 88:386-401.
27. Reed JC. Bcl-2 family proteins: regulators of apoptosis and chemoresistance in hematologic malignancies. *Semin Hematol* 1997; 34:9-19.
28. Strasser A, Harris AW, Bath ML, Cory S. Novel primitive lymphoid tumours induced in transgenic mice by cooperation between myc and bcl-2. *Nature* 1990; 348:331-3.
29. McDonnell TJ, Korsmeyer SJ. Progression from lymphoid hyperplasia to high-grade malignant lymphoma in mice transgenic for the t(14; 18). *Nature* 1991; 349:254-6.
30. Marin MC, Hsu B, Stephens LC, Brisbay S, McDonnell TJ. The functional basis of c-myc and bcl-2 complementation during multistep lymphomagenesis in vivo. *Exp Cell Res* 1995; 217:240-7.
31. Liu Y, Hernandez AM, Shibata D, Cortopassi GA. BCL2 translocation frequency rises with age in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91:8910-4.
32. Ji W, Qu GZ, Ye P, Zhang XY, Halabi S, Ehrlich M. Frequent detection of bcl-2/JH translocations in human blood and organ samples by a quantitative polymerase chain reaction assay. *Cancer Res* 1995; 55:2876-82.
33. Bell DA, Liu Y, Cortopassi GA. Occurrence of bcl-2 oncogene translocation with increased frequency in the peripheral blood of heavy smokers. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87:223-4.
34. Dolken G, Illerhaus G, Hirt C, Mertelsmann R. BCL-2/JH rearrangements in circulating B cells of healthy blood donors and patients with nonmalignant diseases. *J Clin Oncol* 1996; 14:1333-44.
35. Rauzy O, Galoin S, Chale JJ, Adoue D, Albarede JL, Delsol G, et al. Detection of t(14;18) carrying cells in bone marrow and peripheral blood from patients affected by non-lymphoid diseases. *Mol Pathol* 1998; 51:333-8.
36. Horsman DE, Okamoto I, Ludkovski O, Le N, Harder L, Gesk S, et al. Follicular lymphoma lacking the t(14;18)(q32;q21): identification of two disease subtypes. *Br J Haematol* 2003; 120:424-33.
37. Hanada M, Delia D, Aiello A, Stadtmauer E, Reed JC. bcl-2 gene hypomethylation and high-level expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1993; 82:1820-8.
38. Herrinton LJ, Friedman GD. Cigarette smoking and risk of non-Hodgkin's lymphoma subtypes. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1998; 7:25-8.
39. Schroeder JC, Olshan AF, Dent RB, Weinberg CR, Yount B, Cerhan JR, et al. A case-control study of tobacco use and other non-occupational risk factors for t(14;18) subtypes of non-Hodgkin's lymphoma (United States). *Cancer Causes Control* 2002; 13:159-68.

40. Schroeder JC, Olshan AF, Baric R, Dent GA, Weinberg CR, Yount B, et al. Agricultural risk factors for t(14;18) subtypes of non-Hodgkin's lymphoma. *Epidemiology* 2001; 12:701-9.
41. A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma. The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *Blood* 1997; 89:3909-18.
42. Chau I, Jones R, Cunningham D, Wotherspoon A, Maisey N, Norman AR, et al. Outcome of follicular lymphoma grade 3: is anthracycline necessary as front-line therapy? *Br J Cancer* 2003; 89:36-42.
43. Miller TP, LeBlanc M, Grogan TM, Fisher RI. Follicular lymphomas: do histologic subtypes predict outcome? *Hematol Oncol Clin North Am* 1997; 11:893-900.
44. Horning SJ, Rosenberg SA. The natural history of initially untreated low-grade non-Hodgkin's lymphomas. *N Engl J Med* 1984; 311:1471-5.
45. López-Guillermo A, Montserrat E, Bosch F, Escoda L, Terol MJ, Marin P, et al. Low-grade lymphoma: clinical and prognostic studies in a series of 143 patients from a single institution. *Leuk Lymphoma* 1994; 15:159-65.
46. Armitage JO, Weisenburger DD. New approach to classifying non-Hodgkin's lymphomas: clinical features of the major histologic subtypes. Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *J Clin Oncol* 1998; 16:2780-95.
47. Federico M, Vitolo U, Zinzani PL, Chisesi T, Clo V, Bellesi G, et al. Prognosis of follicular lymphoma: a predictive model based on a retrospective analysis of 987 cases. *Intergruppo Italiano Linfomi. Blood* 2000; 95:783-9.
48. Perea G, Altes A, Montoto S, Lopez-Guillermo A, Bosch F, Jimenez M, et al. International and italian prognostic indexes in follicular lymphoma. *Haematologica* 2003; 88:700-4.
49. Tura S, Mazza P, Lauria F, Fiacchini M, Pileri S, Poletti G, et al. Non-Hodgkin's lymphomas in leukaemic phase: incidence, prognosis and therapeutic implications. *Scand J Haematol* 1985; 35:123-31.
50. Romaguera JE, McLaughlin P, North L, Dixon D, Silvermintz KB, Garnsey LA, et al. Multivariate analysis of prognostic factors in stage IV follicular low-grade lymphoma: a risk model. *J Clin Oncol* 1991; 9:762-9.
51. López-Guillermo A, Montserrat E, Bosch F, Terol MJ, Campo E, Rozman C. Applicability of the International Index for aggressive lymphomas to patients with low-grade lymphoma. *J Clin Oncol* 1994; 12:1343-8.
52. Hanson CA, Kurtin PJ, Katzmann JA, Hoyer JD, Li CY, Hodnefield JM, et al. Immunophenotypic analysis of peripheral blood and bone marrow in the staging of B-cell malignant lymphoma. *Blood* 1999; 94:3889-96.

53. Obeso G, Sanz ER, Rivas C, Marcos B, Garcia-Delgado R, Echezarreta G, et al. B-cell follicular lymphomas: clinical and biological characteristics. *Leuk Lymphoma* 1994; 16:105-11.
54. Wood LA, Coupland RW, North SA, Palmer MC. Outcome of advanced stage low grade follicular lymphomas in a population-based retrospective cohort. *Cancer* 1999; 85:1361-8.
55. Cabanillas F, Horning S, Kaminski M, Champlin R. Managing Indolent Lymphomas in Relapse: Working Our Way Through a Plethora of Options. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)* 2000; 166-79.
56. Fisher RI, Jones RB, DeVita VT, Jr., Simon RM, Garvin AJ, Berard CW, et al. Natural history of malignant lymphomas with divergent histologies at staging evaluation. *Cancer* 1981; 47:2022-5.
57. Grigg AP, Gascoyne RD, Barnett MJ. Spontaneous regression of chemotherapy-refractory non-Hodgkin's lymphoma preceding the development of secondary leukaemia. *Leuk Lymphoma* 1996; 20:351-3.
58. Lewis ID, To LB. Spontaneous regression of relapsed non-Hodgkin's lymphoma in a patient who received an autologous transplant for primary resistant disease. *Bone Marrow Transplant* 1997; 20:251-3.
59. Nakano M, Kawanishi Y, Kuriyama Y, Iwase O, Miyazawa K, Aizawa S, et al. Spontaneous reduction of leukemic lymphoma cells possibly by anti-tumor antibody-mediated phagocytosis; a kappa lambda-dual-positive B cell lymphoma. *Leukemia* 2000; 14:278-84.
60. Hsu FJ, Caspar CB, Czerwinski D, Kwak LW, Liles TM, Syrengelas A, et al. Tumor-specific idiotype vaccines in the treatment of patients with B-cell lymphoma--long-term results of a clinical trial. *Blood* 1997; 89:3129-35.
61. Gattiker HH, Wiltshaw E, Galton DA. Spontaneous regression in non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer* 1980; 45:2627-32.
62. Drobyski WR, Qazi R. Spontaneous regression in non-Hodgkin's lymphoma: clinical and pathogenetic considerations. *Am J Hematol* 1989; 31:138-41.
63. McLaughlin P. Progress and promise in the treatment of indolent lymphomas. *Oncologist* 2002; 7:217-25.
64. Czuczman MS, Fallon A, Mohr A, Stewart C, Bernstein ZP, McCarthy P, et al. Rituximab in combination with CHOP or fludarabine in low-grade lymphoma. *Semin Oncol* 2002; 29:36-40.
65. Johnson PW, Rohatiner AZ, Whelan JS, Price CG, Love S, Lim J, et al. Patterns of survival in patients with recurrent follicular lymphoma: a 20-year study from a single center. *J Clin Oncol* 1995; 13:140-7.

66. LoCoco F., Gaidano G, Louie DC, Offit K, Chaganti RS, Dalla-Favera R. p53 mutations are associated with histologic transformation of follicular lymphoma. *Blood* 1993; 82:2289-95.
67. Sander CA, Yano T, Clark HM, Harris C, Longo DL, Jaffe ES, et al. p53 mutation is associated with progression in follicular lymphomas. *Blood* 1993; 82:1994-2004.
68. Pinyol M, Cobo F, Bea S, Jares P, Nayach I, Fernandez PL, et al. p16(INK4a) gene inactivation by deletions, mutations, and hypermethylation is associated with transformed and aggressive variants of non-Hodgkin's lymphomas. *Blood* 1998; 91:2977-84.
69. Yano T, Jaffe ES, Longo DL, Raffeld M. MYC rearrangements in histologically progressed follicular lymphomas. *Blood* 1992; 80:758-67.
70. Garvin AJ, Simon RM, Osborne CK, Merrill J, Young RC, Berard CW. An autopsy study of histologic progression in non-Hodgkin's lymphomas. 192 cases from the National Cancer Institute. *Cancer* 1983; 52:393-8.
71. Risdall R, Hoppe RT, Warnke R. Non-Hodgkin's lymphoma: a study of the evolution of the disease based upon 92 autopsied cases. *Cancer* 1979; 44:529-42.
72. Bastion Y, Sebban C, Berger F, Felman P, Salles G, Dumontet C, et al. Incidence, predictive factors, and outcome of lymphoma transformation in follicular lymphoma patients. *J Clin Oncol* 1997; 15:1587-94.
73. Yuen AR, Kamel OW, Halpern J, Horning SJ. Long-term survival after histologic transformation of low-grade follicular lymphoma. *J Clin Oncol* 1995; 13:1726-33.
74. Ersboll J, Schultz HB, Pedersen-Bjergaard J, Nissen NI. Follicular low-grade non-Hodgkin's lymphoma: long-term outcome with or without tumor progression. *Eur J Haematol* 1989; 42:155-63.
75. Foran JM, Apostolidis J, Papamichael D, Norton AJ, Matthews J, Amess JA, et al. High-dose therapy with autologous haematopoietic support in patients with transformed follicular lymphoma: a study of 27 patients from a single centre. *Ann Oncol* 1998; 9:865-9.
76. Berglund A, Enblad G, Carlson K, Glimelius B, Hagberg H. Long-term follow-up of autologous stem-cell transplantation for follicular and transformed follicular lymphoma. *Eur J Haematol* 2000; 65:17-22.
77. Bartlett NL, Rizeq M, Dorfman RF, Halpern J, Horning SJ. Follicular large-cell lymphoma: intermediate or low grade? *J Clin Oncol* 1994; 12:1349-57.
78. Martin AR, Weisenburger DD, Chan WC, Ruby EI, Anderson JR, Vose JM, et al. Prognostic value of cellular proliferation and histologic grade in follicular lymphoma. *Blood* 1995; 85:3671-8.

79. Rodriguez J, McLaughlin P, Hagemeister FB, Fayad L, Rodriguez MA, Santiago M, et al. Follicular large cell lymphoma: an aggressive lymphoma that often presents with favorable prognostic features. *Blood* 1999; 93:2202-7.
80. Rodriguez J, McLaughlin P, Fayad L, Santiago M, Hess M, Rodriguez MA, et al. Follicular large cell lymphoma: long-term follow-up of 62 patients treated between 1973-1981. *Ann Oncol* 2000; 11:1551-6.
81. Wendum D, Sebban C, Gaulard P, Coiffier B, Tilly H, Cazals D, et al. Follicular large-cell lymphoma treated with intensive chemotherapy: an analysis of 89 cases included in the LNH87 trial and comparison with the outcome of diffuse large B-cell lymphoma. Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte. *J Clin Oncol* 1997; 15:1654-63.
82. Anderson JR, Vose JM, Bierman PJ, Weisenberger DD, Sanger WG, Pierson J, et al. Clinical features and prognosis of follicular large-cell lymphoma: a report from the Nebraska Lymphoma Study Group. *J Clin Oncol* 1993; 11:218-24.
83. Soubeyran P, Eghbali H, Bonichon F, Trojani M, Richaud P, Hoerni B. Low-grade follicular lymphomas: analysis of prognosis in a series of 281 patients. *Eur J Cancer* 1991; 27:1606-13.
84. Leonard RC, Hayward RL, Prescott RJ, Wang JX. The identification of discrete prognostic groups in low grade non-Hodgkin's lymphoma. The Scotland and Newcastle Lymphoma Group Therapy Working Party. *Ann Oncol* 1991; 2:655-62.
85. Cameron DA, Leonard RC, Mao JH, Prescott RJ. Identification of prognostic groups in follicular lymphoma. The Scotland and Newcastle Lymphoma Group Therapy Working Party. *Leuk Lymphoma* 1993; 10:89-99.
86. Parker D, Alison DL, Barnard DL, Child JA, Dovey G, Farish J, et al. Prognosis in low grade non-Hodgkin's lymphoma: relevance of the number of sites involved, absolute lymphocyte count and serum immunoglobulin level. *Hematol Oncol* 1994; 12:15-27.
87. Decaudin D, Lepage E, Brousse N, Brice P, Harousseau JL, Belhadj K, et al. Low-grade stage III-IV follicular lymphoma: multivariate analysis of prognostic factors in 484 patients--a study of the groupe d'Etude des lymphomes de l'Adulte. *J Clin Oncol* 1999; 17:2499-505.
88. Cabanillas F, Smith T, Bodey GP, Gutterman JU, Freireich EJ. Nodular malignant lymphomas: factors affecting complete response rate and survival. *Cancer* 1979; 44:1983-9.
89. Gallagher CJ, Gregory WM, Jones AE, Stansfeld AG, Richards MA, Dhaliwal HS, et al. Follicular lymphoma: prognostic factors for response and survival. *J Clin Oncol* 1986; 4:1470-80.
90. Montoto S, Rives S, Hernández-Boluda J, Cid J, Ferrer A, Camós M, et al. Initial features and prognostic factors in a series of 209 patients with follicular lymphoma. *Haematologica* 1999; 84(Suppl 1):79a.

91. Foussard C, Desablens B, Sensebe L, Francois S, Milpied N, Deconinck E, et al. Is the International Prognostic Index for aggressive lymphomas useful for low-grade lymphoma patients? Applicability to stage III-IV patients. The GOELAMS Group, France. *Ann Oncol* 1997; 8 Suppl 1:49-52.
92. Solal-Celigny P, Lepage E, Brousse N, Reyes F, Haioun C, Lepage M, et al. Recombinant interferon alfa-2b combined with a regimen containing doxorubicin in patients with advanced follicular lymphoma. Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte. *N Engl J Med* 1993; 329:1608-14.
93. Litam P, Swan F, Cabanillas F, Tucker SL, McLaughlin P, Hagemester FB, et al. Prognostic value of serum beta-2 microglobulin in low-grade lymphoma. *Ann Intern Med* 1991; 114:855-60.
94. Bastion Y, Berger F, Bryon PA, Felman P, Ffrench M, Coiffier B. Follicular lymphomas: assessment of prognostic factors in 127 patients followed for 10 years. *Ann Oncol* 1991; 2 Suppl 2:123-9.
95. A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project. *N Engl J Med* 1993; 329:987-94.
96. Solal-Céligny Ph, Roy P. Follicular lymphoma international prognostic project (FLIPP). *Blood* 2004; in press.
97. Coiffier B, Bastion Y, Berger F, Felman P, Bryon PA. Prognostic factors in follicular lymphomas. *Semin Oncol* 1993; 20:89-95.
98. Maartense E, Le Cessie S, Kluin-Nelemans HC, Kluin PM, Snijder S, Wijermans PW, et al. Age-related differences among patients with follicular lymphoma and the importance of prognostic scoring systems: analysis from a population-based non-Hodgkin's lymphoma registry. *Ann Oncol* 2002; 13:1275-84.
99. Spinolo JA, Cabanillas F, Dixon DO, Khorana SM, McLaughlin P, Velasquez WS, et al. Therapy of relapsed or refractory low-grade follicular lymphomas: factors associated with complete remission, survival and time to treatment failure. *Ann Oncol* 1992; 3:227-32.
100. Weisdorf DJ, Andersen JW, Glick JH, Oken MM. Survival after relapse of low-grade non-Hodgkin's lymphoma: implications for marrow transplantation. *J Clin Oncol* 1992; 10:942-7.
101. Davidge-Pitts M, Dansey R, Bezwoda WR. Salvage treatment after failure or relapse following initial chemotherapy for follicular non-Hodgkin's lymphoma. *Leuk Lymphoma* 1997; 24:341-7.
102. Peterson BA, Petroni GR, Frizzera G, Barcos M, Bloomfield CD, Nissen NI, et al. Prolonged single-agent versus combination chemotherapy in indolent follicular lymphomas: a study of the cancer and leukemia group B. *J Clin Oncol* 2003; 21:5-15.

103. Ezdinli EZ, Costello WG, Kucuk O, Berard CW. Effect of the degree of nodularity on the survival of patients with nodular lymphomas. *J Clin Oncol* 1987; 5:413-8.
104. Levine EG, Arthur DC, Frizzera G, Peterson BA, Hurd DD, Bloomfield CD. Cytogenetic abnormalities predict clinical outcome in non-Hodgkin lymphoma. *Ann Intern Med* 1988; 108:14-20.
105. Tilly H, Rossi A, Stamatoullas A, Lenormand B, Bigorgne C, Kunlin A, et al. Prognostic value of chromosomal abnormalities in follicular lymphoma. *Blood* 1994; 84:1043-9.
106. Viardot A, Moller P, Hogel J, Werner K, Mechttersheimer G, Ho AD, et al. Clinicopathologic correlations of genomic gains and losses in follicular lymphoma. *J Clin Oncol* 2002; 20:4523-30.
107. López-Guillermo A, Cabanillas F, McDonnell TI, McLaughlin P, Smith T, Pugh W, et al. Correlation of bcl-2 rearrangement with clinical characteristics and outcome in indolent follicular lymphoma. *Blood* 1999; 93:3081-7.
108. Johnson A, Brun A, Dictor M, Rambech E, Akerman M, Anderson H. Incidence and prognostic significance of t(14;18) translocation in follicle center cell lymphoma of low and high grade. A report from southern Sweden. *Ann Oncol* 1995; 6:789-94.
109. Yunis JJ, Mayer MG, Arnesen MA, Aeppli DP, Oken MM, Frizzera G. bcl-2 and other genomic alterations in the prognosis of large-cell lymphoma. *N Engl J Med* 1989; 320:1047-54.
110. Pezzella F, Jones M, Ralfkiaer E, Ersboll J, Gatter KC, Mason DY. Evaluation of bcl-2 protein expression and 14;18 translocation as prognostic markers in follicular lymphoma. *Br J Cancer* 1992; 65:87-9.
111. Bertoni F, Bosshard G, Roggero E, Ceresa E, Cavalli F, Zucca E. Clinical relevance of bcl-2(MBR)/J(H) rearrangement detected by polymerase chain reaction in the peripheral blood of patients with follicular lymphoma. *Br J Cancer* 1997; 76:36-9.
112. Hermine O, Haioun C, Lepage E, d'Agay MF, Briere J, Lavignac C, et al. Prognostic significance of bcl-2 protein expression in aggressive non-Hodgkin's lymphoma. Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte (GELA). *Blood* 1996; 87:265-72.
113. Kramer MH, Hermans J, Parker J, Krol AD, Kluin-Nelemans JC, Haak HL, et al. Clinical significance of bcl2 and p53 protein expression in diffuse large B-cell lymphoma: a population-based study. *J Clin Oncol* 1996; 14:2131-8.
114. Hill ME, MacLennan KA, Cunningham DC, Vaughan HB, Burke M, Clarke P, et al. Prognostic significance of BCL-2 expression and bcl-2 major breakpoint region rearrangement in diffuse large cell non-Hodgkin's lymphoma: a British National Lymphoma Investigation Study. *Blood* 1996; 88:1046-51.



115. Gascoyne RD, Adomat SA, Krajewski S, Krajewska M, Horsman DE, Tolcher AW, et al. Prognostic significance of Bcl-2 protein expression and Bcl-2 gene rearrangement in diffuse aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1997; 90:244-51.
116. Lee MS, Chang KS, Cabanillas F, Freireich EJ, Trujillo JM, Stass SA. Detection of minimal residual cells carrying the t(14;18) by DNA sequence amplification. *Science* 1987; 237:175-8.
117. Stetler-Stevenson M, Raffeld M, Cohen P, Cossman J. Detection of occult follicular lymphoma by specific DNA amplification. *Blood* 1988; 72:1822-5.
118. Johnson PW, Swinbank K, MacLennan S, Colomer D, Debuire B, Diss T, et al. Variability of polymerase chain reaction detection of the bcl-2-IgH translocation in an international multicentre study. *Ann Oncol* 1999; 10:1349-54.
119. Summers KE, Goff LK, Wilson AG, Gupta RK, Lister TA, Fitzgibbon J. Frequency of the Bcl-2/IgH rearrangement in normal individuals: implications for the monitoring of disease in patients with follicular lymphoma. *J Clin Oncol* 2001; 19:420-4.
120. Lopez-Guillermo A, Cabanillas F, McLaughlin P, Smith T, Hagemester F, Rodriguez MA, et al. The clinical significance of molecular response in indolent follicular lymphomas. *Blood* 1998; 91:2955-60.
121. Rambaldi A, Lazzari M, Manzoni C, Carlotti E, Arcaini L, Baccarani M, et al. Monitoring of minimal residual disease after CHOP and rituximab in previously untreated patients with follicular lymphoma. *Blood* 2002; 99:856-62.
122. Gribben JG, Neuberg D, Freedman AS, Gimmi CD, Pesek KW, Barber M, et al. Detection by polymerase chain reaction of residual cells with the bcl-2 translocation is associated with increased risk of relapse after autologous bone marrow transplantation for B-cell lymphoma. *Blood* 1993; 81:3449-57.
123. Hardingham JE, Kotasek D, Sage RE, Gooley LT, Mi JX, Dobrovic A, et al. Significance of molecular marker-positive cells after autologous peripheral-blood stem-cell transplantation for non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 1995; 13:1073-9.
124. Apostolidis J, Gupta RK, Grenzeliass D, Johnson PW, Pappa VI, Summers KE, et al. High-dose therapy with autologous bone marrow support as consolidation of remission in follicular lymphoma: long-term clinical and molecular follow-up. *J Clin Oncol* 2000; 18:527-36.
125. Price CG, Meerabux J, Murtagh S, Cotter FE, Rohatiner AZ, Young BD, et al. The significance of circulating cells carrying t(14;18) in long remission from follicular lymphoma. *J Clin Oncol* 1991; 9:1527-32.
126. Lambrechts AC, Hupkes PE, Dorssers LC, van't Veer MB. Clinical significance of t(14; 18)-positive cells in the circulation of patients with stage III or IV follicular non-Hodgkin's lymphoma during first remission. *J Clin Oncol* 1994; 12:1541-6.

127. Lambrechts AC, Hupkes PE, Dorssers LC, van't Veer MB. Translocation (14;18)-positive cells are present in the circulation of the majority of patients with localized (stage I and II) follicular non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1993; 82:2510-6.
128. Finke J, Slanina J, Lange W, Dolken G. Persistence of circulating t(14;18)-positive cells in long-term remission after radiation therapy for localized-stage follicular lymphoma. *J Clin Oncol* 1993; 11:1668-73.
129. Mandigers CM, Meijerink JP, Mensink EJ, Tonnissen EL, Hebeda KM, Bogman MJ, et al. Lack of correlation between numbers of circulating t(14;18)-positive cells and response to first-line treatment in follicular lymphoma. *Blood* 2001; 98:940-4.
130. Soubeyran P, Tönissen E, Hostein I, Valk P, Borst E, Johnson PW et al. Multicenter quality control of quantification of t(14;18)-positive cells in non-Hodgkin's lymphoma. An EORTC Lymphoma Study Group study. *Ann Oncol* 2004; 13(Suppl 2):228a.
131. Tsimberidou AM, Jiang Y, Ford RJ, Lichtiger B, Medeiros LJ, McLaughlin P, et al. Quantitative real-time polymerase chain reaction for detection of circulating cells with t(14;18) in volunteer blood donors and patients with follicular lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2002; 43:1589-98.
132. Chang CC, Bredeson C, Juckett M, Logan B, Keever-Taylor CA. Tumor load in patients with follicular lymphoma post stem cell transplantation may correlate with clinical course. *Bone Marrow Transplant* 2003; 32:287-91.
133. Hirt C, Dolken G. Quantitative detection of t(14;18)-positive cells in patients with follicular lymphoma before and after autologous bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2000; 25:419-26.
134. Young RC, Longo DL, Glatstein E, Ihde DC, Jaffe ES, DeVita VT, Jr. The treatment of indolent lymphomas: watchful waiting v aggressive combined modality treatment. *Semin Hematol* 1988; 25:11-6.
135. Brice P, Bastion Y, Lepage E, Brousse N, Haioun C, Moreau P, et al. Comparison in low-tumor-burden follicular lymphomas between an initial no-treatment policy, prednimustine, or interferon alfa: a randomized study from the Groupe d'Etude des Lymphomes Folliculaires. *Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte. J Clin Oncol* 1997; 15:1110-7.
136. Ardesna KM, Smith P, Norton A, Hancock BW, Hoskin PJ, MacLennan KA, et al. Long-term effect of a watch and wait policy versus immediate systemic treatment for asymptomatic advanced-stage non-Hodgkin lymphoma: a randomised controlled trial. *Lancet* 2003; 362:516-22.
137. Mac Manus MP, Hoppe RT. Is radiotherapy curative for stage I and II low-grade follicular lymphoma? Results of a long-term follow-up study of patients treated at Stanford University. *J Clin Oncol* 1996; 14:1282-90.

138. Mac Manus MP, Hoppe RT. Overview of treatment of localized low-grade lymphomas. *Hematol Oncol Clin North Am* 1997; 11:901-18.
139. Mauch P. Follicular non-Hodgkin's lymphoma: the role of radiation therapy. *Ann Hematol* 2001; 80 Suppl 3:B63-B65.
140. Seymour JF, Pro B, Fuller LM, Manning JT, Hagemeister FB, Romaguera J, et al. Long-term follow-up of a prospective study of combined modality therapy for stage I-II indolent non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 2003; 21:2115-22.
141. Murtha AD, Rupnow BA, Hansosn J, Knox SJ, Hoppe R. Long-term follow-up of patients with Stage III follicular lymphoma treated with primary radiotherapy at Stanford University. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001; 49:3-15.
142. Hoppe RT, Kushlan P, Kaplan HS, Rosenberg SA, Brown BW. The treatment of advanced stage favorable histology non-Hodgkin's lymphoma: a preliminary report of a randomized trial comparing single agent chemotherapy, combination chemotherapy, and whole body irradiation. *Blood* 1981; 58:592-8.
143. Gisselbrecht C, Cosset J. Treatment of low-grade non-Hodgkin's lymphomas. 1993; 317-36.
144. Kennedy BJ, Bloomfield CD, Kiang DT, Vosika G, Peterson BA, Theologides A. Combination versus successive single agent chemotherapy in lymphocytic lymphoma. *Cancer* 1978; 41:23-8.
145. Rosenberg SA. Karnofsky memorial lecture. The low-grade non-Hodgkin's lymphomas: challenges and opportunities. *J Clin Oncol* 1985; 3:299-310.
146. Lister TA, Cullen MH, Beard ME, Brearley RL, Whitehouse JM, Wrigley PF, et al. Comparison of combined and single-agent chemotherapy in non-Hodgkin's lymphoma of favourable histological type. *Br Med J* 1978; 1:533-7.
147. Portlock CS, Fischer DS, Cadman E, Lundberg WB, Levy A, Bobrow S, et al. High-dose pulse chlorambucil in advanced, low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer Treat Rep* 1987; 71:1029-31.
148. Cavallin-Stahl E, Moller TR. Prednimustine v cyclophosphamide-vincristine-prednisolone in the treatment of non-Hodgkin's lymphoma with favorable histopathology: results of a national cancer care program in Sweden. *Semin Oncol* 1986; 13:19-22.
149. Jones SE, Grozea PN, Metz EN, Haut A, Stephens RL, Morrison FS, et al. Superiority of adriamycin-containing combination chemotherapy in the treatment of diffuse lymphoma: a Southwest Oncology Group study. *Cancer* 1979; 43:417-25.
150. Lepage E, Sebban C, Gisselbrecht C, Coiffier B, Harousseau JL, Bryon PA, et al. Treatment of low-grade non-Hodgkin's lymphomas: assessment of doxorubicin in a controlled trial. *Hematol Oncol* 1990; 8:31-9.

151. Dana BW, Dahlberg S, Nathwani BN, Chase E, Coltman C, Miller TP, et al. Long-term follow-up of patients with low-grade malignant lymphomas treated with doxorubicin-based chemotherapy or chemoimmunotherapy. *J Clin Oncol* 1993; 11:644-51.
152. Tsimberidou AM, McLaughlin P, Younes A, Rodriguez MA, Hagemester FB, Sarris A, et al. Fludarabine, mitoxantrone, dexamethasone (FND) compared with an alternating triple therapy (ATT) regimen in patients with stage IV indolent lymphoma. *Blood* 2002; 100:4351-7.
153. Bellosillo B, Villamor N, Colomer D, Pons G, Montserrat E, Gil J. In vitro evaluation of fludarabine in combination with cyclophosphamide and/or mitoxantrone in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999; 94:2836-43.
154. Hochster HS, Oken MM, Winter JN, Gordon LI, Raphael BG, Bennett JM, et al. Phase I study of fludarabine plus cyclophosphamide in patients with previously untreated low-grade lymphoma: results and long-term follow-up--a report from the Eastern Cooperative Oncology Group. *J Clin Oncol* 2000; 18:987-94.
155. Montoto S, López-Guillermo A, Domingo-Domènech E, Ribera J, Altés A, Estany C, et al. High clinical and molecular response rates with fludarabine, cyclophosphamide and mitoxantrone (FCM) in previously untreated patients with advanced stage follicular lymphoma (FL). *Blood* 2003; 102(11):1456a.
156. Bosch F, Perales M, Cobo F, Esteve J, Rafel M, López-Guillermo A, et al. Fludarabine, cyclophosphamide and mitoxantrone (FCM) therapy in resistant or relapsed chronic lymphocytic leukemia (CLL) or follicular lymphoma (FL). *Blood* 1997; 90(Suppl 1):530a.
157. Crawley CR, Foran JM, Gupta RK, Rohatiner AZ, Summers K, Matthews J, et al. A phase II study to evaluate the combination of fludarabine, mitoxantrone and dexamethasone (FMD) in patients with follicular lymphoma. *Ann Oncol* 2000; 11:861-5.
158. Ketterer N, Salles G, Moullet I, Dumontet C, ElJaafari-Corbin A, Tremisi P, et al. Factors associated with successful mobilization of peripheral blood progenitor cells in 200 patients with lymphoid malignancies. *Br J Haematol* 1998; 103:235-42.
159. Tournilhac O, Cazin B, Lepretre S, Divine M, Maloum K, Delmer A, et al. Impact of frontline fludarabine and cyclophosphamide combined treatment on peripheral blood stem cell mobilization in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2004; 103:363-5.
160. Micallef IN, Apostolidis J, Rohatiner AZ, Wiggins C, Crawley CR, Foran JM, et al. Factors which predict unsuccessful mobilisation of peripheral blood progenitor cells following G-CSF alone in patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Hematol J* 2000; 1:367-73.
161. Micallef IN, Lillington DM, Apostolidis J, Amess JA, Neat M, Matthews J, et al. Therapy-related myelodysplasia and secondary acute myelogenous leukemia

- after high-dose therapy with autologous hematopoietic progenitor-cell support for lymphoid malignancies. *J Clin Oncol* 2000; 18:947-55.
162. Peterson B, Petroni G, Oken MM, Johnson JL, Barcos M, Cooper M et al. Cyclophosphamide versus cyclophosphamide plus interferon alfa2b in follicular low-grade lymphomas: an intergroup phase III trial (CALGB 8691 and EST 7486). *Proceedings of ASCO* 1997; 16:14a.
  163. Arranz R, Garcia-Alfonso P, Sobrino P, Zamora P, Carrion R, Garcia-Larana J, et al. Role of interferon alfa-2b in the induction and maintenance treatment of low-grade non-Hodgkin's lymphoma: results from a prospective, multicenter trial with double randomization. *J Clin Oncol* 1998; 16:1538-46.
  164. Rohatiner A, Radford J, Deakin D, Earl H, Love SB, Price O, et al. A randomized controlled trial to evaluate the role of interferon as initial and maintenance therapy in patients with follicular lymphoma. *Br J Cancer* 2001; 85:29-35.
  165. Smalley RV, Weller E, Hawkins MJ, Oken MM, O'Connell MJ, Haase-Statz S, et al. Final analysis of the ECOG I-COPA trial (E6484) in patients with non-Hodgkin's lymphoma treated with interferon alfa (IFN-alpha2a) plus an anthracycline-based induction regimen. *Leukemia* 2001; 15:1118-22.
  166. Hagenbeek A, Carde P, Meerwaldt JH, Somers R, Thomas J, De Bock R, et al. Maintenance of remission with human recombinant interferon alfa-2a in patients with stages III and IV low-grade malignant non-Hodgkin's lymphoma. European Organization for Research and Treatment of Cancer Lymphoma Cooperative Group. *J Clin Oncol* 1998; 16:41-7.
  167. Fisher RI, Dana BW, LeBlanc M, Kjeldsberg C, Forman JD, Unger JM, et al. Interferon alpha consolidation after intensive chemotherapy does not prolong the progression-free survival of patients with low-grade non-Hodgkin's lymphoma: results of the Southwest Oncology Group randomized phase III study 8809. *J Clin Oncol* 2000; 18:2010-6.
  168. Solal-Celigny P, Lepage E, Brousse N, Tendler CL, Brice P, Haioun C, et al. Doxorubicin-containing regimen with or without interferon alfa-2b for advanced follicular lymphomas: final analysis of survival and toxicity in the Groupe d'Etude des Lymphomes Folliculaires 86 Trial. *J Clin Oncol* 1998; 16:2332-8.
  169. Rohatiner A, Gregory W, Peterson B, Smalley R, Solal-Celigny P, Hagenbeek A, et al. A meta-analysis (MA) of randomised trials evaluating the role of interferon (IFN) as treatment for follicular lymphoma. *Proceedings of ASCO* 1998; 17(1):11a.
  170. Allen IE, Ross SD, Borden SP, Monroe MW, Kupelnick B, Connelly JE, et al. Meta-analysis to assess the efficacy of interferon-alpha in patients with follicular non-Hodgkin's lymphoma. *J Immunother* 2001; 24:58-65.
  171. Rohatiner A, Gregory W, Peterson B, Smalley R, Solal-Celigny P, Hagenbeek A, et al. A meta-analysis of randomised studies evaluating the role of interferon alpha as treatment for follicular lymphoma (FL). *Proceedings of ASCO* 2002; 21(1):1053a.

172. Maloney DG, Grillo-Lopez AJ, Bodkin DJ, White CA, Liles TM, Royston I, et al. IDEC-C2B8: results of a phase I multiple-dose trial in patients with relapsed non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 1997; 15:3266-74.
173. McLaughlin P, Grillo-Lopez AJ, Link BK, Levy R, Czuczman MS, Williams ME, et al. Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program. *J Clin Oncol* 1998; 16:2825-33.
174. Piro LD, White CA, Grillo-Lopez AJ, Janakiraman N, Saven A, Beck TM, et al. Extended Rituximab (anti-CD20 monoclonal antibody) therapy for relapsed or refractory low-grade or follicular non-Hodgkin's lymphoma. *Ann Oncol* 1999; 10:655-61.
175. Igarashi T, Kobayashi Y, Ogura M, Kinoshita T, Ohtsu T, Sasaki Y, et al. Factors affecting toxicity, response and progression-free survival in relapsed patients with indolent B-cell lymphoma and mantle cell lymphoma treated with rituximab: a Japanese phase II study. *Ann Oncol* 2002; 13:928-43.
176. Witzig TE, Gordon LI, Cabanillas F, Czuczman MS, Emmanouilides C, Joyce R, et al. Randomized controlled trial of yttrium-90-labeled ibritumomab tiuxetan radioimmunotherapy versus rituximab immunotherapy for patients with relapsed or refractory low-grade, follicular, or transformed B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 2002; 20:2453-63.
177. Colombat P, Salles G, Brousse N, Eftekhari P, Soubeyran P, Delwail V, et al. Rituximab (anti-CD20 monoclonal antibody) as single first-line therapy for patients with follicular lymphoma with a low tumor burden: clinical and molecular evaluation. *Blood* 2001; 97:101-6.
178. Ghielmini M, Schmitz SF, Cogliatti SB, Pichert G, Hummerjohann J, Waltzer U, et al. Prolonged treatment with rituximab in patients with follicular lymphoma significantly increases event-free survival and response duration compared with the standard weekly x 4 schedule. *Blood* 2004; 103:4416-23.
179. Alas S, Bonavida B, Emmanouilides C. Potentiation of fludarabine cytotoxicity on non-Hodgkin's lymphoma by pentoxifylline and rituximab. *Anticancer Res* 2000; 20:2961-6.
180. Di Gaetano N, Xiao Y, Erba E, Bassan R, Rambaldi A, Golay J, et al. Synergism between fludarabine and rituximab revealed in a follicular lymphoma cell line resistant to the cytotoxic activity of either drug alone. *Br J Haematol* 2001; 114:800-9.
181. Chow KU, Sommerlad WD, Boehrer S, Schneider B, Seipelt G, Rummel MJ, et al. Anti-CD20 antibody (IDEC-C2B8, rituximab) enhances efficacy of cytotoxic drugs on neoplastic lymphocytes in vitro: role of cytokines, complement, and caspases. *Haematologica* 2002; 87:33-43.
182. Demidem A, Lam T, Alas S, Hariharan K, Hanna N, Bonavida B. Chimeric anti-CD20 (IDEC-C2B8) monoclonal antibody sensitizes a B cell lymphoma cell line to cell killing by cytotoxic drugs. *Cancer Biother Radiopharm* 1997; 12:177-86.

183. Czuczman MS, Grillo-Lopez AJ, White CA, Saleh M, Gordon L, LoBuglio AF, et al. Treatment of patients with low-grade B-cell lymphoma with the combination of chimeric anti-CD20 monoclonal antibody and CHOP chemotherapy. *J Clin Oncol* 1999; 17:268-76.
184. Zinzani PL, Pulsoni A, Perrotti A, Soverini S, Zaja F, De Renzo A, et al. Fludarabine Plus Mitoxantrone With and Without Rituximab Versus CHOP With and Without Rituximab As Front-Line Treatment for Patients With Follicular Lymphoma. *J Clin Oncol* 2004; 22:2654-61.
185. Hiddemann W, Dreyling M, Unterhalt M. Rituximab plus chemotherapy in follicular and mantle cell lymphomas. *Semin Oncol* 2003; 30:16-20.
186. Kaminski MS, Estes J, Zasadny KR, Francis IR, Ross CW, Tuck M, et al. Radioimmunotherapy with iodine (<sup>131</sup>I) tositumomab for relapsed or refractory B-cell non-Hodgkin lymphoma: updated results and long-term follow-up of the University of Michigan experience. *Blood* 2000; 96:1259-66.
187. Waters JS, Webb A, Cunningham D, Clarke PA, Raynaud F, di Stefano F, et al. Phase I clinical and pharmacokinetic study of bcl-2 antisense oligonucleotide therapy in patients with non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 2000; 18:1812-23.
188. Colombat P, Cornillet P, Deconinck E, Tourani JM, Gardembas M, Delain M, et al. Value of autologous stem cell transplantation with purged bone marrow as first-line therapy for follicular lymphoma with high tumor burden: a GOELAMS phase II study. *Bone Marrow Transplant* 2000; 26:971-7.
189. Horning SJ, Negrin RS, Hoppe RT, Rosenberg SA, Chao NJ, Long GD, et al. High-dose therapy and autologous bone marrow transplantation for follicular lymphoma in first complete or partial remission: results of a phase II clinical trial. *Blood* 2001; 97:404-9.
190. Ladetto M, Corradini P, Vallet S, Benedetti F, Vitolo U, Martelli M, et al. High rate of clinical and molecular remissions in follicular lymphoma patients receiving high-dose sequential chemotherapy and autografting at diagnosis: a multicenter, prospective study by the Gruppo Italiano Trapianto Midollo Osseo (GITMO). *Blood* 2002; 100:1559-65.
191. Morel P, Laporte JP, Noel MP, Lopez M, Douay L, Fouillard L, et al. Autologous bone marrow transplantation as consolidation therapy may prolong remission in newly diagnosed high-risk follicular lymphoma: a pilot study of 34 cases. *Leukemia* 1995; 9:576-82.
192. Bierman PJ, Vose JM, Anderson JR, Bishop MR, Kessinger A, Armitage JO. High-dose therapy with autologous hematopoietic rescue for follicular low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 1997; 15:445-50.
193. Freedman AS, Neuberg D, Mauch P, Soiffer RJ, Anderson KC, Fisher DC, et al. Long-term follow-up of autologous bone marrow transplantation in patients with relapsed follicular lymphoma. *Blood* 1999; 94:3325-33.

194. Brice P, Simon D, Bouabdallah R, Belanger C, Haioun C, Thieblemont C, et al. High-dose therapy with autologous stem-cell transplantation (ASCT) after first progression prolonged survival of follicular lymphoma patients included in the prospective GELF 86 protocol. *Ann Oncol* 2000; 11:1585-90.
195. Schouten HC, Qian W, Kvaloy S, Porcellini A, Hagberg H, Johnson HE, et al. High-dose therapy improves progression-free survival and survival in relapsed follicular non-Hodgkin's lymphoma: results from the randomized European CUP trial. *J Clin Oncol* 2003; 21:3918-27.
196. Bastion Y, Brice P, Haioun C, Sonet A, Salles G, Marolleau JP, et al. Intensive therapy with peripheral blood progenitor cell transplantation in 60 patients with poor-prognosis follicular lymphoma. *Blood* 1995; 86:3257-62.
197. Chen CI, Crump M, Tsang R, Stewart AK, Keating A. Autotransplants for histologically transformed follicular non-Hodgkin's lymphoma. *Br J Haematol* 2001; 113:202-8.
198. Williams CD, Harrison CN, Lister TA, Norton AJ, Blystad AK, Coiffier B, et al. High-dose therapy and autologous stem-cell support for chemosensitive transformed low-grade follicular non-Hodgkin's lymphoma: a case-matched study from the European Bone Marrow Transplant Registry. *J Clin Oncol* 2001; 19:727-35.
199. Stein RS, Greer JP, Goodman S, Kallianpur A, Ahmed MS, Wolff SN. High-dose therapy with autologous or allogeneic transplantation as salvage therapy for small cleaved cell lymphoma of follicular center cell origin. *Bone Marrow Transplant* 1999; 23:227-33.
200. Friedberg JW, Neuberg D, Stone RM, Alyea E, Jallow H, LaCasce A, et al. Outcome in patients with myelodysplastic syndrome after autologous bone marrow transplantation for non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 1999; 17:3128-35.
201. Krishnan A, Bhatia S, Slovak ML, Arber DA, Niland JC, Nademanee A, et al. Predictors of therapy-related leukemia and myelodysplasia following autologous transplantation for lymphoma: an assessment of risk factors. *Blood* 2000; 95:1588-93.
202. Metayer C, Curtis RE, Vose J, Sobocinski KA, Horowitz MM, Bhatia S, et al. Myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia after autotransplantation for lymphoma: a multicenter case-control study. *Blood* 2003; 101:2015-23.
203. Hosing C, Munsell M, Yazji S, Andersson B, Couriel D, de Lima M, et al. Risk of therapy-related myelodysplastic syndrome/acute leukemia following high-dose therapy and autologous bone marrow transplantation for non-Hodgkin's lymphoma. *Ann Oncol* 2002; 13:450-9.
204. Verdonck LF, Dekker AW, Lokhorst HM, Petersen EJ, Nieuwenhuis HK. Allogeneic versus autologous bone marrow transplantation for refractory and recurrent low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1997; 90:4201-5.



205. van Besien K, Sobocinski KA, Rowlings PA, Murphy SC, Armitage JO, Bishop MR, et al. Allogeneic bone marrow transplantation for low-grade lymphoma. *Blood* 1998; 92:1832-6.
206. Forrest DL, Thompson K, Nevill TJ, Couban S, Fernandez LA. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for progressive follicular lymphoma. *Bone Marrow Transplant* 2002; 29:973-8.
207. van Besien K, Loberiza FR, Jr., Bajorunaite R, Armitage JO, Bashey A, Burns LJ, et al. Comparison of autologous and allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for follicular lymphoma. *Blood* 2003; 102:3521-9.
208. van Besien KW, de Lima M, Giralt SA, Moore DF, Jr., Khouri IF, Rondon G, et al. Management of lymphoma recurrence after allogeneic transplantation: the relevance of graft-versus-lymphoma effect. *Bone Marrow Transplant* 1997; 19:977-82.
209. Mandigers CM, Meijerink JP, Raemaekers JM, Schattenberg AV, Mensink EJ. Graft-versus-lymphoma effect of donor leucocyte infusion shown by real-time quantitative PCR analysis of t(14;18). *Lancet* 1998; 352:1522-3.
210. Khouri IF, Saliba RM, Giralt SA, Lee MS, Okoroji GJ, Hagemester FB, et al. Nonablative allogeneic hematopoietic transplantation as adoptive immunotherapy for indolent lymphoma: low incidence of toxicity, acute graft-versus-host disease, and treatment-related mortality. *Blood* 2001; 98:3595-9.
211. Ho AY, Devereux S, Mufti GJ, Pagliuca A. Reduced-intensity rituximab-BEAM-CAMPATH allogeneic haematopoietic stem cell transplantation for follicular lymphoma is feasible and induces durable molecular remissions. *Bone Marrow Transplant* 2003; 31:551-7.
212. Marks DI, Lush R, Cavenagh J, Milligan DW, Schey S, Parker A, et al. The toxicity and efficacy of donor lymphocyte infusions given after reduced-intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 2002; 100:3108-14.
213. Rodriguez MA, Cabanillas FC, Velasquez W, Hagemester FB, McLaughlin P, Swan F, et al. Results of a salvage treatment program for relapsing lymphoma: MINE consolidated with ESHAP. *J Clin Oncol* 1995; 13:1734-41.
214. Lopez R, Martino R, Brunet S, Sureda A, Domingo-Albos A, Sierra J. Salvage chemotherapy with IAPVP-16 for advanced refractory or relapsed follicular lymphomas. *Haematologica* 1999; 84:911-6.
215. Cohen Y, Solal-Celigny P, Polliack A. Rituximab therapy for follicular lymphoma: a comprehensive review of its efficacy as primary treatment, treatment for relapsed disease, re-treatment and maintenance. *Haematologica* 2003; 88:811-23.
216. Davis TA, Grillo-Lopez AJ, White CA, McLaughlin P, Czuczman MS, Link BK, et al. Rituximab anti-CD20 monoclonal antibody therapy in non-Hodgkin's lymphoma: safety and efficacy of re-treatment. *J Clin Oncol* 2000; 18:3135-43.

217. Iqbal S, Jenner MJ, Summers KE, Davies AJ, Matthews J, Norton AJ, et al. Reliable detection of clonal IgH/Bcl2 MBR rearrangement in follicular lymphoma: methodology and clinical significance. *Br J Haematol* 2004; 124:325-8.