



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Linfoma de células grandes B: Caracterización genética y utilidad en el diagnóstico y pronóstico de la biopsia líquida

Alfredo Rivas Delgado

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Linfoma de células grandes B: Caracterización genética y utilidad en el diagnóstico y pronóstico de la biopsia líquida

Memoria de tesis doctoral presentada por

Alfredo Rivas Delgado

para optar al grado de doctor por la Universidad de Barcelona

Dirigida por

Dra. Eva Giné Soca, Hospital Clínic de Barcelona

Dr. Armando López Guillermo, Hospital Clínic de Barcelona, Universidad de
Barcelona

Tutor de la tesis

Dr. Armando López Guillermo, Hospital Clínic de Barcelona, Universidad de
Barcelona

Programa de Doctorado Medicina e Investigación Traslacional

Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud

Universidad de Barcelona

Junio 2023

**“Si he visto más, es poniéndome
sobre los hombros de Gigantes”**

Isaac Newton

AGRADECIMIENTOS

Este apartado es sin duda el más difícil de escribir en esta tesis doctoral, ya que encontrar las palabras adecuadas para expresar mi gratitud puede resultar difícil y temo pueda olvidar a alguien importante.

Sin embargo, algunas frases de canciones han sido de gran ayuda en este momento. La primera de ellas es "Gracias a la vida que me ha dado tanto" de Violeta Parra, dedicada a mi familia. Me siento infinitamente afortunado de contar con unos padres que siempre me han apoyado, en los buenos y malos momentos, y que han sacrificado gran parte de su tiempo para ayudarme a llegar hasta este punto de mi carrera profesional y por enseñarme a ser un buen hijo, hermano y a siempre esforzarme por ser una mejor persona. A mi padre por enseñarme con su ejemplo que, a pesar de las circunstancias adversas, siempre se puede salir adelante. A mi madre, por su cariño infinito y por estar siempre pendiente de mí, asegurándose de que nunca me faltara nada y soportando todas las horas de preocupación. A mi hermana, mi apoyo incondicional, gracias por cuidar de mis padres mientras yo perseguía mis sueños, por tu cariño y sobre todo por regalarme las dos alegrías más grandes de mi vida, mis sobrinos. "Recuérdame, aunque tenga que emigrar" de Robert López, se la dedico a Juan Pablo y Pía, por ser mi motor para seguir adelante y siempre están presentes en mi corazón, aunque esté lejos. También a Ricardo y Leo, quienes completan mi familia. A todos ellos, les pido perdón por todas las ausencias que han tenido que soportar.

Además, tengo la suerte de contar con una segunda familia, esa que se elige y que se sabe que te quiere y que sin su apoyo tampoco habría podido llegar hasta este punto. Aquellos que iniciaron este camino conmigo hace más de 20 años y que todavía siguen a mi lado: Eli, Lilia, Majo, Christian, Gerardo, Poncho, Juanjo; y aquellos que me han hecho sentir como en casa de este lado del Atlántico: Mayra, Gaby, Mau, Miguel, Sergi, Martí, Alex, Valentín, Pedro, María del Mar, Ernest, David, Xavi, Henrieta, María, Albert, Carlos, Roberto.

También quisiera agradecer a mis compañeros del Servicio de Hematología del Hospital Clínic de Barcelona, quienes me han enseñado mucho dentro y fuera del hospital, en especial a mis compañeros linfoides: Julio, Neus, Laura, Juan

Gonzalo y Tycho, y a Nacho, mi compañero y hermanito de residencia. A toda la gente del IDIBAPS de los grupos de Iñaki, Silvia, Patricia, Dolors e Iti con los que he tenido la fortuna de colaborar y de los que he podido aprender todos estos años. A las dos personas sin las que con su apoyo y conocimiento esta tesis no existiría, Ferran y Cristina, les agradezco por embarcarse conmigo en cada uno de los proyectos propuestos y por todos aquellos que espero surjan en el futuro, pero sobre todo por su amistad fuera del laboratorio (no hay suficiente chocolate en el mundo para expresar mi gratitud). También al equipo de genómica, especialmente a Anna, y a Elías, por su criterio y apoyo durante todos estos años en el mundo de la investigación.

A mis compañeros de enfermería, administrativos y técnicos de laboratorio, quienes me brindaron su ayuda y apoyo para que los proyectos en los que trabajamos juntos pudieran culminar con éxito. Un especial reconocimiento a Vanessa, Silvia (Ruiz, Fuentes, Martín), Sandra, Miguel, Noe y Marta.

La frase inicial de esta tesis hace referencia a la importancia de contar con la ayuda y el apoyo para lograr alcanzar nuestros objetivos. En mi caso, esos "gigantes" son mis dos directores, Eva y Armando, quienes han sido fundamentales en mi formación como clínico e investigador. Eva, gracias por enseñarme a ser mejor clínico, por los tirones de oreja cuando tocaban, por acudir a mi rescate cuando lo necesite. En una sesión escuche que un buen mentor debe ser honesto, paciente, accesible, motivador, además de contar con el conocimiento y la experiencia y para mí no hay una de esas características que no cumpla el Dr. López Guillermo. Armando, quiero agradecerte por transmitirme tu pasión por la medicina y la investigación, por tu confianza todos estos años desde que era residente, pero sobre todo por tu amistad y cariño. He aprendido mucho de ti y tu ejemplo ha sido una inspiración constante para mí. Gracias por estar ahí siempre, incluso ahora que emprendo un camino más lejano.

Termino este apartado con una estrofa de una canción de Pau Donés que expresa a la perfección lo que siento tras reflexionar para escribirlo: "Eso que tú me das, no creo lo tenga merecido; Todo lo que me das, te estaré siempre agradecido".

ÍNDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN.....	23
1. LINFOMAS: GENERALIDADES.....	25
1.1 Definición y epidemiología de los linfomas.....	25
1.2 Clasificación de los linfomas de células B.....	25
2. LINFOMA DIFUSO DE CÉLULAS GRANDES B	29
2.1 Definición y epidemiología.....	29
2.2 Etiología.....	29
2.3 Clasificación.....	30
2.3.1 Célula de origen.....	30
2.3.2 Características moleculares	31
2.3.3 Subgrupos genéticos.....	33
2.4 Factores pronósticos	35
2.4.1 Índices pronósticos.....	35
2.4.2 Volumen metabólico tumoral	38
2.5 Tratamiento del LDCGB	40
2.5.1 Tratamiento de primera línea.....	40
2.5.2 Tratamiento de rescate.....	44
3. LINFOMA DE CÉLULAS B PRIMARIO DE MEDIASTINO.....	51
3.1 Definición y epidemiología.....	51
3.2 Presentación clínica.....	51
3.3 Diagnóstico.....	52
3.4 Factores pronósticos	52
3.5 Alteraciones genéticas.....	53
3.6 Tratamiento de primera línea.....	55
3.7 Tratamiento de rescate.....	57
4. LINFOMA DE CÉLULAS GRANDES B TESTICULAR	59
4.1 Definición y epidemiología.....	59
4.2 Presentación clínica, diagnóstico y estadiaje	59
4.3 Patología, características moleculares y alteraciones genéticas	60
4.4 Factores pronósticos	62
4.5 Tratamiento.....	62
5. DNA CIRCULANTE	65
5.1 Generalidades	65
5.2 Consideraciones preanalíticas.....	66
5.3 ctDNA en linfomas	70
5.3.1 Métodos para la detección de ctDNA en linfoma.....	70

5.3.2	Utilidad del ctDNA para el diagnóstico y el genotipado de los linfomas	73
5.3.3	Valor pronóstico del ctDNA.....	76
5.3.4	Utilidad del ctDNA para la monitorización de la respuesta durante el tratamiento y el seguimiento de la enfermedad.....	78
II.	HIPÓTESIS.....	83
III.	OBJETIVOS	87
IV.	MATERIAL, MÉTODOS, Y RESULTADOS.....	91
	PRIMER TRABAJO	93
	SEGUNDO TRABAJO	106
	TERCER TRABAJO.....	133
V.	DISCUSIÓN.....	181
VI.	CONCLUSIONES.....	193
VII.	BIBLIOGRAFÍA.....	197

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Consenso Internacional para la clasificación de las neoplasias linfoides de células B maduras	27
Tabla 2.	Clasificación molecular del LDCGB	34
Tabla 3.	Variables y puntuación de los diferentes índices pronósticos	37
Tabla 4.	SLP y SG a 5 años según los grupos de riesgo de los diferentes índices pronóstico .	37
Tabla 5.	Comparación entre los métodos de segmentación más habituales para el cálculo del VMT en linfoma	40
Tabla 6.	Principales series que evalúan el impacto pronóstico del VMT en LDCGB de nuevo diagnóstico	41
Tabla 7.	Selección de estudios en el tratamiento de primera línea del LDCGB	45
Tabla 8.	Principales ensayos con anticuerpos biespecíficos utilizados en el LDCGB R/R	50
Tabla 9.	Métodos para la detección de ctDNA en linfomas	72
Tabla 10.	Principales estudios de ctDNA en linfomas	80

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diferenciación de la célula B y patogénesis de los diferentes subtipos histológicos de neoplasias linfoides de células B maduras.	26
Figura 2. Características morfológicas e inmuohistoquímicas del LDCGB	29
Figura 3. Célula de origen acorde a la plataforma Lymph2Cx	31
Figura 4. Comparación entre los subgrupos moleculares acorde a las diferentes clasificaciones.	35
Figura 5. Diferentes métodos de segmentación utilizados para calcular el VMT y la GTL en pacientes con linfoma.....	39
Figura 6. Principales antígenos diana de las células CAR-T y anticuerpos utilizados en el tratamiento del LDCGB.	49
Figura 7. Características morfológicas e inmuohistoquímicas del LPM.	53
Figura 8. Vías de señalización implicadas en la patogénesis del LPM.	54
Figura 9. Mecanismos de evasión inmune en la patogénesis del LPM.....	55
Figura 10. Características morfológicas del TLBCL.	61
Figura 11. Alteraciones genéticas en las diferentes vías de señalización implicadas en la patogénesis del TLBCL.	62
Figura 12. Fuentes de DNA circulante en plasma.	65
Figura 13. Procesamiento preanalítico de las muestras.	68
Figura 14. Análisis del tamaño de los fragmentos de DNA mediante el uso de TapeStation. ...	70
Figura 15. Técnicas para el análisis de ctDNA.....	71
Figura 16. Principales aplicaciones del ctDNA en linfoma.	75
Figura 17. Modelo CIRI (Continuous Individualized Risk Index) para pacientes con LDCGB. .	77

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ABC:	célula B de tipo activada
ABVD:	doxorrubicina, bleomicina, vinblastina y dacarbazina
BV:	Brentuximab-Vedotin
CAPP-seq:	<i>Cancer Personalized Profiling by deep sequencing</i>
CAR-T:	<i>Chimeric antigen receptor T-cell</i>
cfDNA:	DNA circulante
ctDNA:	DNA circulante tumoral
DA-EPOCH-R:	Dosis ajustada de etopósido, prednisolona, vincristina, ciclofosfamida, doxorrubicina, rituximab
DH:	Doble hit
DHITsig:	Firma de expresión génica de doble hit
DNA:	Ácido desoxirribonucleico
ECOG:	<i>Eastern Cooperative Oncology Group</i>
EMA:	<i>European Medicines Agency</i>
EMR:	Respuesta molecular temprana/ Enfermedad mínima residual
FDG:	¹⁸ Fluorodesoxiglucosa
FFPE:	Fijado con formalina e incluido en parafina
FISH:	Hibridación fluorescente in situ
GCB:	Célula B de tipo centro germinal
GELTAMO:	Grupo Español de Linfomas y Trasplantes de Médula Ósea
GMSI:	Gammapatía monoclonal de significado incierto
GTL:	Glucólisis total de la lesión
HGBCL:	Linfoma de células B de alto grado
HR:	<i>Hazard ratio</i>
HT:	Transformación histológica
ICC:	Consenso Internacional para la clasificación de las neoplasias linfoides maduras
Ig-HTS:	<i>Immunoglobulin high-throughput sequencing</i>
IHQ:	Inmunohistoquímica
IMPI:	<i>International Metabolic Prognostic Index</i>
IPI:	Índice Pronóstico Internacional
LCM:	Linfoma de células del manto
LCR:	Líquido cefalorraquídeo
LDCGB:	Linfoma difuso de células grandes B
LDH:	Lactato deshidrogenasa sérica
LF:	Linfoma folicular
LH:	Linfoma de Hodgkin
LLC:	Leucemia linfática crónica
LNH:	Linfoma no Hodgkin
LPM:	Linfoma de células B primario de mediastino

MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad
MMR: Respuesta molecular mayor
NCCN: *National Comprehensive Cancer Network*
NGS: Secuenciación de nueva generación
NOS: *Not otherwise specified*
OMS: Organización Mundial de la Salud
OOR: Tasa de respuesta objetiva
PCNSL: Linfoma difuso de células de células grande B primario del sistema nervioso central
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
PET-CT: Tomografía por emisión de positrones
R-ACVBP: Rituximab, doxorrubicina, ciclofosfamida, vindesina, bleomicina y prednisona
R-CEOP: Rituximab, ciclofosfamida, epirubicina, vincristina y prednisolona
R-CHOP: Rituximab, ciclofosfamida, doxorrubicina, vincristina y prednisona
R-DHAP: Rituximab, dexametasona, citarabina en dosis altas y cisplatino
R-GDP: Rituximab, gemcitabina, dexametasona y cisplatino
R-GemOx: Rituximab, gemcitabina y oxaliplatino
R-ICE: Rituximab, ifosfamida, carboplatino y etopósido
RB-CHOP: Rituximab, bortezomib, ciclofosfamida, doxorrubicina, vincristina y prednisona
R/R: Refractario o en recaída
SG: Supervivencia global
SLE: Supervivencia libre de evento
SLP: Supervivencia libre de progresión
SNC: Sistema nervioso central
SUV: Valor de captación estandarizado
TASP: Trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos
TCR: Receptor de células T
TH: Triple hit
TLBCL: Linfoma testicular de células grandes B
ULN: Límite superior de la normalidad
VEB: Virus Epstein Barr
VMT: Volumen metabólico tumoral

TESIS EN FORMATO DE COMPENDIO DE ARTÍCULOS

Esta tesis se ha realizado en formato de compendio de artículos.

La tesis consta de tres artículos dirigidos a responder un objetivo general que se subdivide a su vez en 8 objetivos específicos.

Como objetivo principal común los trabajos tratan de analizar el perfil mutacional al diagnóstico en el linfoma difuso de células grandes (LDCGB) y de dos variantes con personalidad propia, el linfoma de células B primario de mediastino (LPM) y el linfoma testicular de células grandes B (TLBCL), con el objetivo de integrar las anomalías en el número de copias, mutaciones genéticas y reordenamientos, y analizar el impacto clínico, incluida la respuesta al tratamiento y la supervivencia general en la era de la inmunoterapia.

PRIMER TRABAJO

Rivas-Delgado A, Nadeu F, Enjuanes A, Casanueva-Eliceiry S, Mozas P, Magnano L, Castrejón de Anta N, Rovira J, Dlouhy I, Martín S, Osuna M, Rodríguez S, Simó M, Pinyol M, Baumann T, Beà S, Balagué O, Delgado J, Villamor N, Setoain X, Campo E, Giné E, López-Guillermo A. Mutational Landscape and Tumor Burden Assessed by Cell-free DNA in Diffuse Large B-Cell Lymphoma in a Population-Based Study. Clin Cancer Res. 2021;27(2):513-521. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-20-2558

Factor de Impacto JCR 2021: 13.801

Cuartil: Q1 (Oncology)

Los objetivos específicos de este trabajo fueron:

1. Implementar el uso del DNA circulante tumoral (ctDNA) como fuente para determinar el perfil mutacional del LDCGB y comparar los estudios

mutacionales de ctDNA con los resultados obtenidos a partir de la biopsia tisular.

2. Correlacionar los niveles de ctDNA con las variables clínicas iniciales, la respuesta terapéutica y la supervivencia de los pacientes.
3. Correlacionar el valor del volumen metabólico tumoral con las variables clínicas iniciales, los niveles de ctDNA, la respuesta terapéutica y la supervivencia de los pacientes.

SEGUNDO TRABAJO

Rivas-Delgado A, Nadeu F, Andrade-Campos M, López C, Enjuanes A, Mozas P, Frigola G, Colomo L, Sanchez-Gonzalez B, Villamor N, Beà S, Campo E, Salar A, Giné E, López-Guillermo A, Bellosillo B. Cell-Free DNA for Genomic Analysis in Primary Mediastinal Large B-Cell Lymphoma. *Diagnostics*. 2022; 12(7):1575. doi: 10.3390/diagnostics12071575.

Factor de Impacto JCR 2021: 4.129

Cuartil: Q2 (Medicine, General & Internal)

Se centra en los objetivos de esta tesis enumerados a continuación:

1. Implementar el uso del ctDNA como fuente para el estudio genético del LPM, incluido el perfil mutacional y las alteraciones en el número de copias, y compararlo con los resultados obtenidos a partir de la biopsia ganglionar.
2. Correlacionar los niveles de ctDNA con las variables clínicas iniciales, la respuesta terapéutica y la supervivencia de los pacientes.

TERCER TRABAJO

Rivas-Delgado A, López C, Clot G, Nadeu F, Grau M, Frigola G, Bosch J, Radke J, Ishaque N, Alcoceba M, Tapia Melendo G, Luizaga L, Barcena C, Kelleher N, Villamor N, Baumann T, Muntañola A, Sancho-Cia JM, Martín García-Sancho A, Gonzáles Barca E, Matutes E, Karube K, Salaverria I, Enjuanes A, Wiemann S, Heppner FL, Siebert R, Climent F, Campo E, Giné E, López-Guillermo A, Beà S. Testicular Large B-cell Lymphoma is genetically similar to Primary Large B-Cell Lymphoma of the CNS and distinct from nodal Diffuse Large B-cell Lymphoma. Enviado a publicación.

Este trabajo se centra en responder a los siguientes objetivos de esta tesis:

1. Evaluar las mutaciones genéticas, las alteraciones del número de copias, las translocaciones, así como la determinación de la célula de origen en TLBCL, proporcionando un panorama completo de las alteraciones genómicas recurrentes que definen el curso clínico de esta enfermedad.
2. Correlacionar las anomalías genéticas con las principales características clínico-biológicas del linfoma, respuesta y supervivencia de los pacientes.
3. Comparar las alteraciones genéticas recurrentes en el TLBCL con dos cohortes de pacientes: una de pacientes con LDCGB nodal y otra de pacientes de con linfoma primario del sistema nervioso central.

I. INTRODUCCIÓN

1. LINFOMAS: GENERALIDADES

1.1 Definición y epidemiología de los linfomas

Los linfomas constituyen un grupo heterogéneo de neoplasias originadas a partir del crecimiento no controlado de las diferentes células que componen el sistema inmunológico, en particular los linfocitos y sus precursores. El hecho de que estas células deriven de un progenitor linfoide común en la médula ósea o timo, y que posteriormente terminen su maduración en los diferentes órganos secundarios linfoides, como el bazo y los ganglios linfáticos, implica que existan diferentes neoplasias linfoides muy distintas entre sí¹.

Según los últimos datos de GLOBOCAN², se estima que en 2020 se diagnosticaron a nivel mundial 544 352 nuevos casos de linfoma no Hodgkin (LNH), lo que representa el 2.8% de los diagnósticos de cáncer en todo el mundo. El riesgo estandarizado por edad a nivel global es de 6.9 entre los hombres y de 4.8 entre las mujeres, lo que se traduce en un riesgo acumulativo de por vida del 0.73% y el 0.52% para hombres y mujeres, respectivamente. En España, según los datos del registro prospectivo del Grupo Español de Linfomas y Trasplantes de Médula Ósea (GELTAMO) entre enero de 2014 y julio de 2018 se registraron 9 682 casos nuevos de linfoma, siendo el linfoma difuso de células grandes B (LDCGB) y el linfoma folicular (LF) los dos subtipos histológicos más comunes³.

1.2 Clasificación de los linfomas de células B

Hoy en día existen dos clasificaciones para las neoplasias linfoides, la primera propuesta por la Organización Mundial de la Salud (OMS), cuya última edición se actualizó recientemente⁴, y el Consenso Internacional para la clasificación de las neoplasias linfoides maduras (ICC)⁵ que representa un consenso mundial sobre el diagnóstico de estos tumores, adoptado para su uso por patólogos, clínicos y científicos básicos (**Tabla 1**).

El principio fundamental de ambas clasificaciones es el reconocimiento de distintas entidades según una combinación de características morfológicas, inmunofenotípicas, genéticas, moleculares y clínicas. La clasificación actual de

las neoplasias linfoides B se basa en las semejanzas de la célula tumoral con los estadios de diferenciación de la célula B normal ya que, en la mayoría de los casos, la célula tumoral tiende a mimetizarla (**Figura 1**).

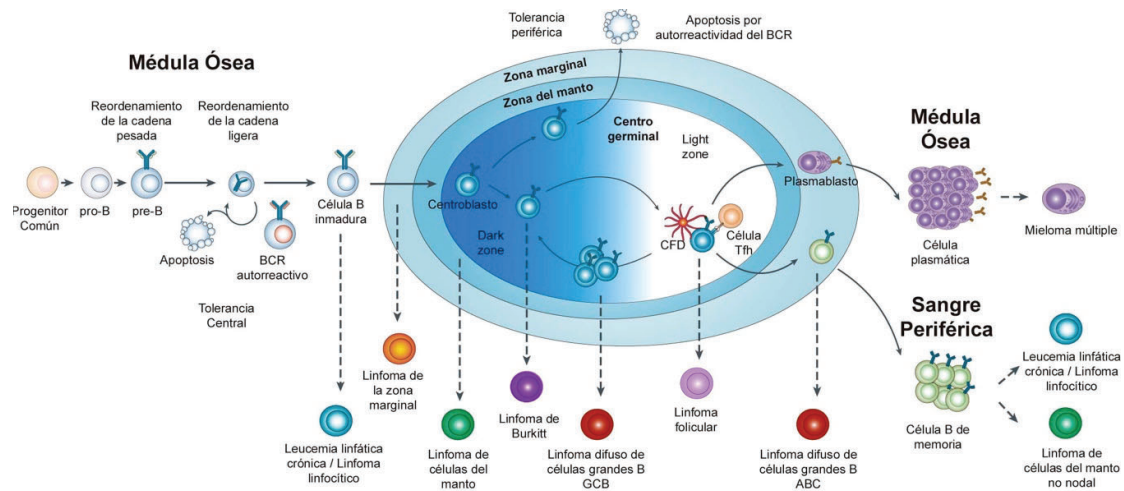


Figura 1. Diferenciación de la célula B y patogénesis de los diferentes subtipos histológicos de neoplasias linfoides de células B maduras.

Se muestra la progresión de una célula B a través del centro germinal, incluidos los tipos de linfoma que pueden originarse en cada una de estas etapas de diferenciación

Tabla 1. Consenso Internacional para la clasificación de las neoplasias linfoides de células B maduras⁵.

- Leucemia linfática crónica (LLC) / linfoma linfocítico de célula pequeña
- Linfocitosis B monoclonal
 - Tipo LLC
 - Tipo no LLC
- Leucemia prolinfocítica de células B
- Linfoma de la zona marginal esplénico
- Tricoleucemia
- Leucemia/linfoma de células B esplénico, no clasificable*
 - Linfoma difuso de la pulpa roja esplénico de células B pequeñas*
 - Tricoleucemia variante*
- Linfoma linfoplasmocítico
 - Macroglobulinemia de Waldenström
- Gammapatía monoclonal de significado incierto (GMSI), IgM
 - GMSI IgM, tipo célula plasmática
 - GMSI IgM, Not otherwise specified (NOS)
- Enfermedad por crioaglutininas primaria
- Enfermedades de cadenas pesadas
 - Enfermedades de cadenas pesadas Mu
 - Enfermedades de cadenas pesadas Gamma
 - Enfermedades de cadenas pesadas Alfa
- Neoplasias de células plasmáticas
 - Gammapatía monoclonal de significado incierto no IgM
 - Mieloma múltiple (mieloma de células plasmáticas)
 - Mieloma múltiple NOS
 - Mieloma múltiple con alteraciones genéticas recurrentes
 - Mieloma múltiple con traslocaciones de *CCND*
 - Mieloma múltiple con traslocaciones de *MAF*
 - Mieloma múltiple con traslocaciones de *NSD2*
 - Mieloma múltiple con hiperdiploidia
 - Plasmocitoma óseo solitario
 - Plasmocitoma extraóseo
- Enfermedad por depósito de inmunoglobulinas monoclonales
 - Amiloidosis de cadenas ligeras de las inmunoglobulinas (AL)
 - AL localizada
 - Enfermedad por depósito de cadenas ligeras y cadenas pesadas
- Linfoma de la zona marginal del tejido linfoide asociado a mucosa (MALT)
- Trastorno linfoproliferativo de la zona marginal primario cutáneo
- Linfoma la zona marginal nodal
 - Linfoma de la zona marginal nodal pediátrico*

- Linfoma folicular
 - Neoplasia folicular In situ
 - Linfoma folicular tipo duodenal
- Linfoma centrofolicular sin reordenamiento de *BCL2*, CD23 positivo*
- Linfoma cutáneo primario centro folicular
- Linfoma folicular tipo pediátrico
- Linfoma folicular testicular
- Linfoma de células grande B con reordenamiento de *IRF4*
- Linfoma de células del manto
 - Neoplasia de células del manto In situ
 - Linfoma del manto no nodal leucemizado
- Linfoma difuso de células grandes B, No especificado (LDCGB)
 - Tipo célula B centro germinal
 - Tipo célula B activada
- Linfoma de células grandes con alteraciones de 11q*
- Linfoma de células B de predominio linfocítico nodular
- Linfoma de células grande B rico en células T/histiocitos
- LDCGB primario del sistema nervioso central
- LDCGB primario testicular
- LDCGB primario cutáneo, tipo pierna
- Linfoma de células grandes B intravascular
- Linfoma primario asociado a derrames HHV8 y VEB negativo*
- Úlcera mucocutánea VEB positiva
- LDCGB Virus Epstein Barr (VEB) positivo
- LDCGB asociado a inflamación crónica
 - LDCGB asociado a fibrina
- Granulomatosis linfomatoide
- Trastorno linfoproliferativo de células B polimórfico asociado a VEB
- Linfoma de células grandes B ALK positivo
- Linfoma plasmablastico
- Trastornos linfoproliferativos asociados a HHV8
 - Enfermedad de Castleman multicéntrica
 - Trastorno linfoproliferativo germinotrópico HHV8 positivo
 - LDCGB HHV8 positivo NOS
 - Linfoma primario de cavidades
- Linfoma de Burkitt
- Linfoma de células B de alto grado con reordenamiento de *MYC* y *BCL2*
- Linfoma de células B de alto grado con reordenamiento de *MYC* y *BCL6**
- Linfoma de células B de alto grado, no especificado
- Linfoma de células grandes B primario de mediastino
- Linfoma de la zona gris del mediastino

* Entidades provisionales

2. LINFOMA DIFUSO DE CÉLULAS GRANDES B

2.1 Definición y epidemiología

El LDCGB es una neoplasia de células linfoides B de mediano/gran tamaño cuyos núcleos son del mismo tamaño o más grande que el de los macrófagos y el doble de tamaño de los linfocitos normales con un patrón de crecimiento difuso (**Figura 2**). Es el síndrome linfoproliferativo más frecuente en el mundo occidental y el paradigma de linfoma agresivo, representando el 25-35% de los casos. Es más frecuente en edades avanzadas, con una mediana de edad al diagnóstico de 65-70 años, aunque puede presentarse en edad pediátrica o en adultos jóvenes¹.

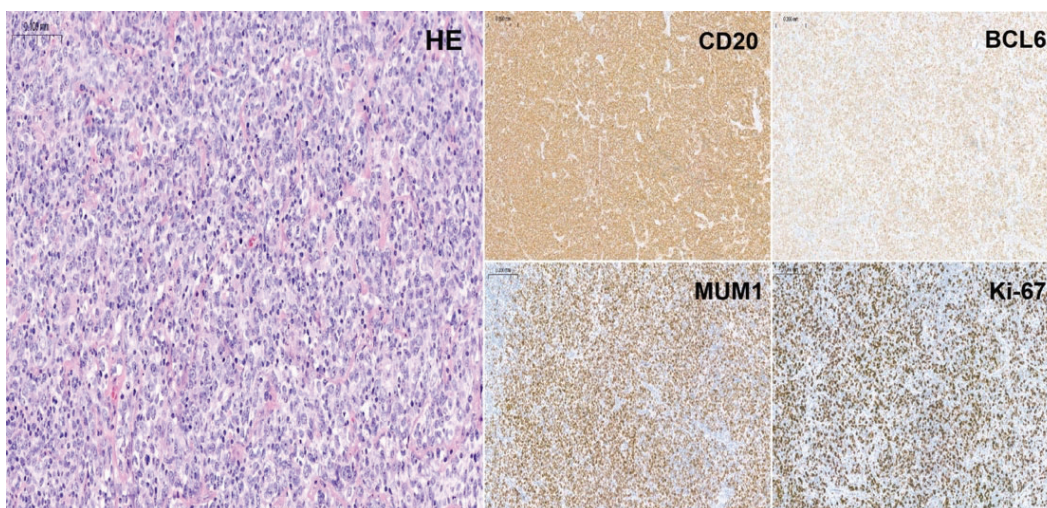


Figura 2. Características morfológicas e inmunohistoquímicas del LDCGB

En la imagen a la izquierda se observa una proliferación linfoide atípica conformada por células grandes con núcleos pleomórficos y nucléolo prominente (HE: Hematoxilina y eosina). A la derecha, técnicas de inmunohistoquímica que evalúan la expresión de diferentes marcadores de diferenciación de células B y el índice de proliferación.

2.2 Etiología

La mayoría de los casos se originan de novo (LDCGB primario), pero algunos casos pueden originarse de la transformación de un linfoma indolente (LDCGB secundario). Si bien la etiología del LDCGB permanece desconocida, estudios

epidemiológicos apoyan su origen multifactorial, con factores de riesgo clínicos, genéticos y de desregulación inmune, así como exposiciones ambientales, víricas u ocupacionales. Ejemplo de ello es el LDCGB que surge en el contexto de inmunodeficiencia, que se asocia más frecuentemente al VEB^{1,6}.

2.3 Clasificación

Aunque considerado una entidad única, el LDCGB muestra una notable heterogeneidad clínico-biológica, en la respuesta terapéutica y en el pronóstico. Durante las últimas dos décadas, los esfuerzos multidisciplinarios de clínicos, patólogos e investigadores han logrado identificar subtipos de LDCGB según la célula de origen (COO) o sus características moleculares⁷.

2.3.1 Célula de origen

El análisis del perfil de expresión génica en el LDCGB mediante *microarrays* ha conseguido diferenciar dos variantes con un patrón indicativo de diferente estadio de diferenciación de la célula B. Así, un tipo expresa genes típicos de la célula B del centro germinal con expresión de CD10 y BCL6 (lo que se conoce como "*germinal center B-like*" o GCB), mientras que el otro se parece más a la célula B de sangre periférica activada o post-centro germinal ("*post-germinal center*" o ABC), caracterizado por la activación crónica de la vía de señalización del receptor de células B, la activación constitutiva del factor nuclear kappa B y la expresión de BCL2 e IRF4. Un tercer grupo corresponde a los casos no clasificados, que representa 10-15%^{8,9}. Además de las sustanciales diferencias biológicas, varios grupos han confirmado el impacto pronóstico de esta clasificación molecular, de manera que los pacientes con LDCGB de origen GCB tienen un devenir más favorable que aquellos con LDCGB de tipo ABC, con una supervivencia libre de progresión (SLP) de 3 años aproximadamente del 75%, frente al 40--50% del subtipo GCB^{6,9-11}. Es por todo ello que actualmente se consideran dos subtipos de LDCGB bien definidos en la ICC⁵. Aunque la determinación de la célula de origen mediante expresión génica se consideran el estándar para determinar la COO, los problemas relacionados con el requisito

Figure 2 consists of two panels. The left panel is a heatmap showing gene expression (log2) for 67 samples from patients with *de novo* DLBCL. The genes listed on the y-axis are: TNFRSF13B, LMO1, IRF4, CREBL2, PIM2, CYBBR2, RAB11, CCR30, RSHDM1, WDSE5, ISY1, MYT1M, PRDM14, SERPINA9, ASB1, MAFK, ITPKB, and STPR2. A color scale on the right indicates relative gene expression from 0.125 (green) to 8 (red). Below the heatmap are three horizontal bar charts: 'Lymph2Cx' (orange), 'Gold standard' (blue), and 'IHC' (orange, blue, and green bars). The right panel is a Kaplan-Meier survival plot showing the probability of survival over 18 years for GCB (orange), UNC (purple), and ABC (blue) subtypes. The p-value is 0.0023.

En la imagen a la izquierda se observa el *heatmap* con los 20 genes incluidos en la plataforma (modificado de Scott D, et al.⁹) y a la derecha la SG de 220 pacientes con LDCGB del Hospital Clínic según subgrupo de COO.

Del 10 al 15% de los pacientes con LDCGB presentan reordenamiento de *MYC*, lo que resulta en una supervivencia y proliferación celular desreguladas. Aproximadamente la mitad de estos casos también conllevan un reordenamiento

BCL2 y/o *BCL6*¹³. Estos reordenamientos genéticos se identifican mediante hibridación fluorescente in situ (FISH) y su presencia define un subconjunto de LDCGB conocido como linfoma doble o triple hit. La ICC ahora comprende 2 grupos distintos: HGBCL con reordenamientos *MYC* y *BCL2* (con o sin reordenamiento *BCL6*) (HGBCL-DH-*BCL2*) y una nueva entidad provisional, HGBCL con reordenamientos *MYC* y *BCL6* (HGBCL-DH-*BCL6*)⁵. Estos pacientes presentan una enfermedad con un curso clínico más agresivo y un peor pronóstico después del tratamiento de primera línea con R-CHOP (rituximab, ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisona), especialmente en pacientes con enfermedad en estadio avanzado¹³⁻¹⁵. Además, datos recientes sugieren que dicho efecto adverso es más evidente cuando el reordenamiento de *MYC* es con un gen asociado a las inmunoglobulinas¹³.

Recientemente, Ennishi y colaboradores¹⁶ establecieron una firma de expresión génica de doble hit (DHITsig) capaz de identificar un subconjunto LDCGB GCB de alto riesgo, con una SLP a 5 años del 57% en comparación con el 81% del resto de la cohorte. Un aspecto para destacar es que los casos de HGBCL-DH/TH sólo representaban el 50% del grupo DHITsig. Un estudio posterior en el que se realizó la secuenciación completa del genoma en 20 casos HGBCL-DH/TH negativos de la misma serie mostró la presencia de reordenamientos crípticos de *MYC* o *BCL2*, no detectables mediante pruebas de rutina dentro del DHITsig+ en 6 (19%) de los casos, lo que podría explicar la desregulación subyacente de *MYC* en estos pacientes¹⁷.

Además, los pacientes con sobreexpresión de *MYC* y *BCL2* detectado por IHQ ($\geq 40\%$ y $> 50\%$, respectivamente), denominados LDCGB doble expresores, tienen un peor pronóstico tras el tratamiento de primera línea^{18,19}. Estos pacientes representan aproximadamente un tercio de los casos de nuevo diagnóstico y hasta el 50% de los LDCGB refractarios o recaídos, situación en la que también se asocian con una peor respuesta al tratamiento de rescate⁷. En resumen, estos datos destacan la necesidad de realizar rutinariamente tanto estudios IHQ como FISH en el momento del diagnóstico y preferentemente también en el momento de la recidiva.

2.3.3 Subgrupos genéticos

El uso de tecnologías de *next generation sequencing* (NGS) ha permitido el estudio del genoma, exoma y perfiles mutaciones específicos del LDCGB, dando lugar a la clasificación en grupos genéticamente definidos que han permitido delinear mejor las distintas entidades biológicas.

Chapuy y colaboradores²⁰ clasificaron 304 LDCGB en cinco grupos diferentes, dos subconjuntos predominantemente constituidos por casos de tipo ABC: C1 de buen pronóstico y caracterizado por mutaciones en *NOTCH2* y reordenamiento de *BCL6* y C5 enriquecido en mutaciones *MYD88*^{L265P} y *CD79B* y con pronóstico adverso; un grupo independiente de ABC/GCB: C2 caracterizado por mutaciones y deleciones de 17p, con pronóstico intermedio; y dos subgrupos enriquecidos en casos GCB: C3 de pronóstico adverso enriquecido en mutaciones de *CREBBP/EZH2* y translocación de *BCL2* y, C4 de buen pronóstico con alteraciones de *SGK1*. Una pequeña fracción de pacientes (4%) sin mutaciones detectables fueron clasificados como C0.

De forma paralela, Schmitz et al²¹ identificaron cuatro subtipos genéticos distintos de LDCGB con mutaciones recurrentes tras analizar 574 biopsias. Estas categorías incluyen los subtipos EZB, BN2, MCD y N1. El subtipo EZB se caracteriza por mutaciones en *EZH2* y translocación de *BCL2*, el subtipo BN2 por fusiones de *BCL6* y mutaciones en *NOTCH2*, el subtipo MCD por la coexistencia de mutaciones de *MYD88*^{L265P} y *CD79B*, y el subtipo N1 por mutaciones en *NOTCH1*. Cabe destacar, que en esta serie hasta el 53.4% de casos no se clasificaron en ninguno de estos cuatro grupos. Posteriormente, el mismo grupo amplió la clasificación incorporando dos grupos más: A53 caracterizado por alteraciones estructurales en el número de copias y de *TP53*, ST2 con mutaciones recurrentes de *TET2* y *SGK1*. Adicionalmente, separaron el grupo EZB en función de la presencia de alteraciones en *MYC*. Así mismo, desarrollaron el LymphGen, un algoritmo que determina la probabilidad de que un paciente pertenezca a uno de los siete subtipos basado en las alteraciones genéticas presentes en el tumor²². Afortunadamente, a pesar de los diferentes enfoques utilizados por ambos grupos, existe una considerable superposición entre ambas clasificaciones (**Tabla 2 y Figura 4**)⁶.

Tabla 2. Clasificación molecular del LDCGB

Grupo	COO	Alteraciones moleculares	Asociaciones con otros linfomas	Vías de señalización	Pronóstico
BN2/C1	>UNC, incluye casos ABC y GCB	Translocación <i>BCL6</i> <i>NOTCH2</i>	Similitud genética con el linfoma de la zona marginal, aunque no hay evidencia directa de transformación	Activación de NFκB y NOTCH2 Evasión inmune	Intermedio
A53/C2	Sin predominio	<i>TP53</i> Del17p		Inestabilidad genética Evasión inmune	Intermedio/ Desfavorable
EZB/C3	GCB	Translocación <i>BCL2</i> <i>BCL2</i> , <i>EZH2</i> , <i>CREBBP</i> , <i>KMT2D</i> , <i>TNFRSF14</i>	Incluye la mayoría de los casos <i>double hit</i> Relación con el linfoma folicular, así como caso con transformación histológica o componente de LDCGB concomitante al diagnóstico	Modificadores de histonas Activación de PI3K Migración celular Interacción celular inmune	Favorable Desfavorable para casos EZH-MYC+
ST2/C4	GCB	<i>SGK1</i> , <i>TET2</i> , <i>SOCS1</i> , <i>ZFP36L1</i> , <i>DUSP2</i>	Linfoma de Hodgkin de predominio linfocítico nodular LDCGB rico en células T o histiocitos	Activación de JAK/STAT, PI3K y ERK	Favorable
MCD/C5	ABC	<i>MYD88</i> , <i>CD79B</i> , <i>PIM1</i> , <i>HLA-B</i> , <i>BTG1</i> , <i>ETV6</i> , <i>CDKN2A</i> , <i>SPIB</i> , <i>OSBPL10</i>	Linfomas con afectación primaria extranodal: sistema nervioso central, testicular, mama, piel, intravascular Linfoma linfoplasmocítico	Activación de la vía de señalización del receptor de célula B y de NFκB	Intermedio/ Desfavorable
N1	ABC	<i>NOTCH1</i>	Leucemia linfática crónica	Activación de NOTCH1	Desfavorable

COO: célula de origen; GCB: centro germinal; ABC: célula B activada; UNC: No clasificable

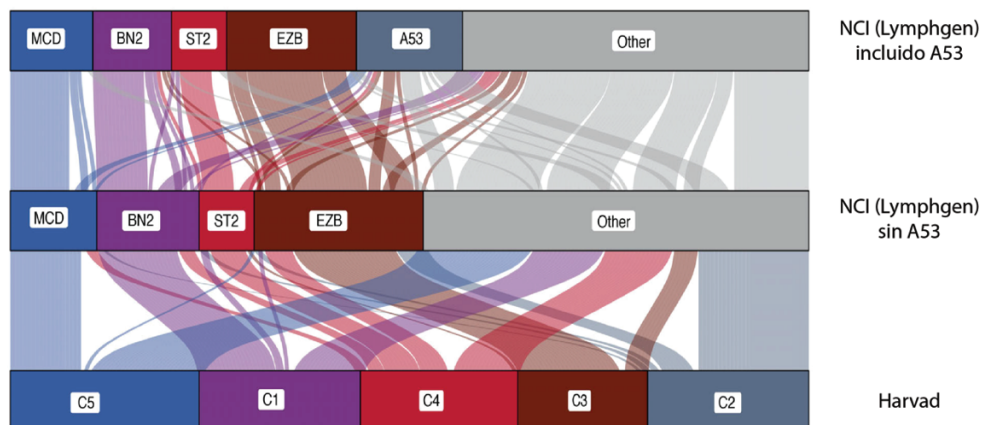


Figura 4. Comparación entre los subgrupos moleculares acorde a las diferentes clasificaciones.

El diagrama aluvial muestra la proporción de casos de la cohorte de Harvard reclasificados mediante el algoritmo LymphGen, con o sin incluir el subgrupo A53. El gráfico demuestra un consenso relativamente alto entre ambos sistemas de clasificación (Modificado de Morin RD, et al²³).

2.4 Factores pronósticos

2.4.1 Índices pronósticos

Como ya se mencionó, el LDCGB presenta una gran heterogeneidad clínica. Se han descrito un gran número de factores clínicos y analíticos con valor pronóstico en los pacientes con LDCGB. Asimismo, se han desarrollado varios índices pronósticos que contemplando algunas de tales variables permiten estratificar a los pacientes en diferentes grupos de riesgo.

El índice Pronóstico Internacional (IPI) se publicó en 1993 y hoy en día sigue siendo ampliamente utilizado en la práctica clínica habitual²⁴. Se asigna 1 punto a cada factor pronóstico adverso: edad >60 años, lactato deshidrogenasa sérica (LDH) por encima del límite superior de la normalidad (ULN), enfermedad en estadio III/IV de Ann Arbor, estado funcional de acuerdo con el *Eastern Cooperative Oncology Group* (ECOG) ≥ 2 y más de un sitio con afectación extranodal. Con ello, se clasifica a los pacientes en 4 grupos de riesgo según la puntuación total: riesgo bajo (0-1 puntos), riesgo intermedio bajo (2 puntos), riesgo intermedio alto (3 puntos) y riesgo alto (4-5 puntos), con una tasa de SG a 5 años que va del 26% para el grupo de alto riesgo al 73% para aquellos

pacientes en el grupo de bajo riesgo. Aunque este fue desarrollado en la era pre-rituximab, ha sido validado en pacientes tratados con R-CHOP^{25,26}.

El IPI revisado (R-IPI)²⁷ se desarrolló específicamente para pacientes con LDCGB tratados con R-CHOP, utilizando los mismos factores de riesgo y el mismo sistema de puntuación que el IPI, pero agrupando a los pacientes en sólo 3 grupos de riesgo: muy buen pronóstico (0 puntos), buen pronóstico (1-2 puntos) y mal pronóstico (3-5 puntos), con una SG a 4 años del 94%, 79% y 55% respectivamente para cada grupo. Posteriormente, los mismos autores desarrollaron el NCCN-IPI utilizando la base de datos del *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN)²⁸, incorporando la mayoría de los parámetros que el IPI/R-IPI, como el ECOG ≥ 2 y la enfermedad en estadio III/IV de Ann Arbor, pero asignando puntuaciones diferentes al resto de factores. Así, la edad se clasificó en 3 grupos (>75 años= 3 puntos, >60 años= 2 puntos y >40 años= 1 punto), la LDH se clasificó en 2 grupos (>3 veces ULN= 2 puntos, >1 vez ULN= 1 punto) y en lugar de usar el número de sitios extranodales, la afectación de la médula ósea, el sistema nervioso central, el hígado/tracto gastrointestinal o el pulmón contabilizaban con 1 punto. El puntaje total para el NCCN-IPI varía de 0 a 8 puntos: riesgo bajo (0-1), riesgo intermedio bajo (2-3), riesgo intermedio alto (4-5) y riesgo alto (6-8). La tasa de SG a 5 años según los grupos de riesgo oscilaba entre el 33% y el 96%, identificando mejor aquellos pacientes con muy mal pronóstico.

Finalmente, el grupo GELTAMO también validó un índice pronóstico propio, el GELTAMO-IPI, incluyendo el valor de la $\beta 2$ -microglobulina dentro de los factores adversos, y con ajustes en la puntuación de la edad y el ECOG, con una SG a 5 años que varía del 93% para el grupo de bajo riesgo hasta el 39% para el de alto riesgo (**Tabla 3 y 4**)²⁹.

Ruppert y colaboradores²⁵, evaluaron a un total de 2124 pacientes con LDCGB tratados con R-CHOP en 7 ensayos clínicos, con el propósito de identificar el índice pronóstico que mejor discriminaba la SG de los pacientes. Los resultados mostraron que las estimaciones de SG a cinco años variaron desde un 54% hasta un 88% utilizando IPI, del 61% al 93% usando el R-IPI, y del 49% al 92% utilizando el NCCN-IPI. El NCCN-IPI mostró la mayor diferencia absoluta en la

estimación de la SG entre los grupos de alto y bajo riesgo, demostrando una mejor discriminación al determinar la SG (índice de concordancia de 0.632 frente a 0.626 del IPI y 0.590 del R-IPI).

Tabla 3. Variables y puntuación de los diferentes índices pronósticos

Variable	IPI/R-IPI	Valor	NCCN-IPI	Valor	GELTAMO-IPI	Valor
Edad (años)	>60	1	>40 a ≤60	1	<65	0
			>60 a ≤75	2	>65 a ≤79	1
			>75	3	≥ 80	2
Estadio Ann Arbor	III-IV	1	III-IV	1	III-IV	1
LDH, normalizada	>1	1	>1 a ≤3	1	>1	1
			>3	2		
Afectación extranodal	≥2	1	MO, SNC, GI, Pulmón	1	NA	
ECOG	≥2	1	≥2	1	2	1
					3-4	2
β2M, normalizada	NA		NA		> 1	1
Máxima puntuación		5		8		7

Tabla 4. SLP y SG a 5 años según los grupos de riesgo de los diferentes índices pronóstico

Índice	Puntos	SLP a 5 años (%)	SG a 5 años (%)
IPI (N= 2031)			
Bajo	0-1	70	73
Intermedio bajo	2	50	51
Intermedio alto	3	49	43
Alto	4-5	40	26
R-IPI (N= 365)			
Bajo	0	94	94
Intermedio	1-2	80	79
Alto	3-5	53	55
NCCN-IPI (1650)			
Bajo	0-1	91	96
Intermedio bajo	2-3	74	82
Intermedio alto	4-5	51	64
Alto	6-8	30	43
GELTAMO-IPI (N=1848)			
Bajo	0	NA	93
Intermedio bajo	1-3	NA	79
Intermedio alto	4	NA	66
Alto	5-7	NA	39

2.4.2 Volumen metabólico tumoral

La tomografía por emisión de positrones (PET-CT) con ^{18}F -fluorodesoxiglucosa (FDG) se ha convertido en el estándar para la estadificación y la evaluación de la respuesta en el LDCGB, esta última utilizando los criterios de Deauville (escala de 1 a 5), que utiliza la captación del mediastino y del hígado como referencia, considerando como respuesta metabólica completa a aquellos pacientes con un Deauville score de 1 a 3³⁰.

Nuevas métricas prometedoras derivadas del análisis del PET/CT basal, que permite una estimación de la carga tumoral y del metabolismo, se proponen como biomarcadores: 1) el volumen metabólico tumoral (VMT), que es la suma de las regiones tumorales con captación de FDG; y 2) la glucólisis total de la lesión (GTL) que es la suma de estas regiones ponderada por la intensidad de su captación de FDG.

Se han propuesto varios métodos para medir el VMT, pero actualmente no existe un método estandarizado. Sin embargo, en la práctica clínica el método más utilizado, por su simplicidad y por su amplia disponibilidad, consiste en utilizar umbrales basados en el valor de captación estandarizado (SUV) para segmentar los tumores, entre ellos un umbral SUV fijo (en muchas ocasiones SUV2,5), un umbral dependiente del SUV máximo del interior del volumen de interés (normalmente un porcentaje) y un umbral dependiente de un factor fisiológico del paciente (SUV máximo o medio mediastínico, SUV máximo o medio hepático o algún valor dependiente de ellos) (**Figura 5**)³¹.

Estos métodos han sido comparados entre ellos para intentar identificar que método es el óptimo para el cálculo del VMT en pacientes con LDCGB en dos series independientes. Si bien, todos los métodos predijeron la SLP y la SG con una precisión similar, los puntos de corte variaban notablemente de un método a otro, siendo el $\text{SUV} \geq 2,5$ tuvo la mejor concordancia entre observadores y fue más fácil de aplicar^{31,32} (**Tabla 5**).

El VMT se ha correlacionado con diferentes índices pronósticos como el IPI o el NCCN-IPI, así como con algunos de sus factores individuales como los niveles séricos de LDH o el estadio de Ann Arbor, así como con la presencia de enfermedad voluminosa (*bulky* en la terminología anglosajona). Por otro lado, el

VMT no parece correlacionarse con características biológicas como la COO, la expresión de MYC o de BCL2³³. Varios estudios retrospectivos han demostrado que un VMT alto se asocia significativamente con una peor supervivencia libre de progresión (SLP) o SG en el LDCGB (**Tabla 6**), aunque algunos de ellos han incluido una amplia gama de subgrupos de pacientes con LDCGB y han utilizado diferentes métodos de segmentación con puntos de corte muy variados. De hecho, algunos de ellos tienen un tamaño muestral muy reducido, lo que ha limitado la validez externa y la aplicación directa en la práctica habitual. A pesar de estas limitaciones, los datos disponibles sugieren que el VMT se puede utilizar para estratificar el riesgo de los pacientes con LDCGB que reciben inmunoterapia, y que este efecto es independiente a otros factores pronósticos bien establecidos en el LDCGB³³.

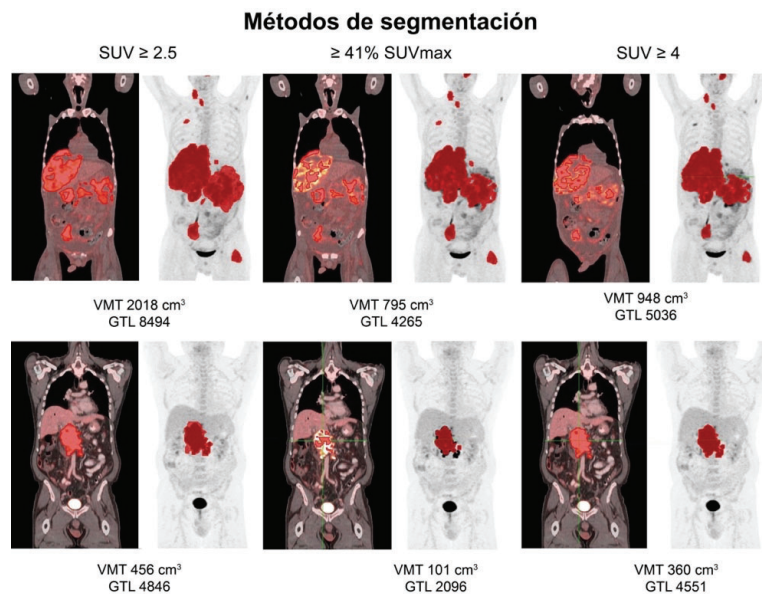


Figura 5. Diferentes métodos de segmentación utilizados para calcular el VMT y la GTL en pacientes con linfoma.

Pacientes con LDCGB con alta (superior) y baja carga tumoral (inferior). Como se puede observar la elección del método de segmentación impacta de forma significativa en la determinación del VMT y la GTL. Imágenes cortesía del Servicio de Medicina Nuclear del Hospital Clínic de Barcelona.

Tabla 5. Comparación entre los métodos de segmentación más habituales para el cálculo del VMT en linfoma. (Modificada de El-Galaly et al³³)

Método	Ventajas	Desventajas
Umbral SUV fijo (SUV \geq 2.5)	Definido por un parámetro Reproducible Muy poca variación interobservador Menos variación entre diferentes equipos de PET	Sobrestima el VMT en tumores muy ávidos al FDG. Influenciado por los métodos de reconstrucción Influenciado por las características del paciente (glicemia, tiempo de absorción)
Umbral dependiente del SUV máximo del interior del volumen de interés (\geq 41% SUVmax)	Definido por un parámetro Reproducible	Mayor variación interobservador. Subestima el verdadero VMT en tumores con captación heterogénea. Mayor variación entre diferentes equipos de PET Influenciado por las características del paciente (glicemia, tiempo de absorción)
Umbral dependiente de un factor fisiológico (SUV medio hepático \pm 2 DE)	Definido por pocos parámetros Toma en cuenta las características del paciente (glicemia, tiempo de absorción)	Mayor variación interobservador.

2.5 Tratamiento del LDCGB

2.5.1 Tratamiento de primera línea

El esquema de inmunoterapia R-CHOP ha sido el tratamiento estándar de primera línea durante las últimas dos décadas desde que se inició la inmunoterapia. Esta modalidad puede ser curativa en hasta en el 60% de los casos, aunque aproximadamente el 20% de los pacientes no son candidatos para tratamiento intensivo debido al estado general, la edad, comorbilidades o disfunción cardíaca. Se ha demostrado que aquellos pacientes que han permanecido libres de enfermedad durante 2 años tras de la terapia de primera línea presentan una supervivencia similar a las de la población general^{6,7,34}.

Tabla 6. Principales series que evalúan el impacto pronóstico del VMT en LDCGB de nuevo diagnóstico

Autor	Método utilizado	Punto de corte (cm³)	Pronóstico	Observaciones
Song ³⁵ (N= 169)	SUV ≥ 2.5	220	SLP 3 años: 90% vs. 56% SG 3 años: 93% vs. 58%	Sólo se incluyeron pacientes con estadios II-III
Sasanelli ³⁶ (N=114)	≥ 41% SUVmax	550	SLP 3 años: 77% vs. 60% SG 3 años: 87% vs. 60%	Pacientes tratados con R-CHOP/R-ACVBP
Song ³⁷ (N= 107)	SUV ≥ 2.5	600	SLP 2 años: 80% vs. 20% SG 3 años: 80% vs. 20%	El 100% de los pacientes tenían afectación de MO
Cottreau ³⁸ (N= 81)	≥41% SUVmax	300	SLP 5 años: 75% vs. 42% SG 5 años: 78% vs. 46%	Pacientes tratados con R-CHOP/ R-ACVBP
Mikhaeel ³⁹ (N= 147)	SUV ≥ 2.5	400	SLP 5 años: 87% vs. 42% SG 5 años: 89% vs. 55%	
Vercellino ⁴⁰ (N=301)	≥ 41% SUVmax	220	SLP 4 años: 82% vs. 56% SG 4 años: 92% vs. 74%	EC REMARC: R-CHOP +/- mantenimiento con lenalidomida. El VMT asociado al ECOG identificó una población de LDCGB de alto riesgo
Kostakoglu ⁴¹ (N=1305)	SUV>1.5 veces del SUVmedio hepático	366	SLP 4 años: 75% vs. 60% SG 4 años: 87% vs. 65%	EC GOYA: R-CHOP vs. G-CHOP. El VMT alto se asoció a IPI de alto riesgo y la COO (no centrogerminal), identificando un subgrupo de pronóstico muy desfavorable
Schmitz ⁴² (N= 510)	≥ 41% SUVmax	328	SLP 2 años: 89% vs. 58% SG 2 años: 94% vs. 72%	El VMT se correlacionó con todos los parámetros del IPI, excepto la edad. El VMT alto y una pobre respuesta en el PET interim se asoció con una peor SLP y SG.

Se han realizado múltiples intentos de mejorar los resultados obtenidos con R-CHOP (**Tabla 7**), incluidos la intensificación de la terapia disminuyendo el intervalo entre los ciclos de tratamiento a 14 días, la utilización de regímenes inmunoquimioterapia intensivos o la consolidación con un trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos, sin que esto se tradujera en beneficio en la supervivencia de los pacientes⁴³⁻⁴⁶. La sustitución de rituximab por obinutuzumab, otro anticuerpo monoclonal anti-CD20, tampoco demostró un beneficio adicional^{47,48}. La terapia de mantenimiento tras el R-CHOP con agentes como rituximab o lenalidomida, también ha sido evaluada en ensayos clínicos fase 3, sin lograr demostrar un beneficio adicional en la SG de los pacientes^{49,50}. En un ensayo aleatorizado, el esquema DA-EPOCH-R (dosis ajustada de etopósido, prednisolona, vincristina, ciclofosfamida, doxorrubicina, rituximab) se asoció a mayor toxicidad y no mejoró la SLP o SG en comparación con R-CHOP⁵¹. El tratamiento con R-ACVBP (rituximab, doxorrubicina, ciclofosfamida, vindesina, bleomicina y prednisona) ha sido el único régimen intensivo que ha demostrado proporcionar una ventaja de supervivencia sobre R-CHOP en una población muy concreta de pacientes con una puntuación IPI ajustada por edad de 1, sin embargo, la toxicidad asociada ha limitado su utilización en la práctica clínica habitual⁵².

El ensayo aleatorizado fase 3 PHOENIX⁵⁴ comparó la adición de ibrutinib, un inhibidor de la tirosina quinasa de Bruton, al R-CHOP en pacientes con LDCGB no centrogerminal (determinado mediante IHQ) no mostró diferencias significativas en los resultados entre ambos grupos, aunque en un análisis secundario se observó un beneficio de supervivencia con la adición de ibrutinib en pacientes menores de 60 años, así como aquellos con sobreexpresión de BCL2 y MYC. El análisis posterior de las biopsias de los pacientes para establecer los subtipos genéticos previamente descritos demostró una supervivencia libre de evento (SLE) a 3 años del 100% en el grupo ≤60 años de los subtipos MCD y N1 tratados con ibrutinib más R-CHOP, siendo significativamente inferior los pacientes tratados únicamente con R-CHOP (42.9% y 50%, respectivamente, $P < 0.02$)⁵⁵. Estos resultados probablemente reflejan la heterogeneidad dentro del subgrupo de COO, además de que el

beneficio clínico que puede tener el incorporar los nuevos fármacos puede estar contrarrestado por el aumento de las toxicidades y la necesidad de reducción de dosis en pacientes mayores⁷.

En los estudios fase 2 (REAL07 y MC078E)^{56,57} se demostró que la adición de lenalidomida (R²-CHOP) en pacientes con LDCGB no GCB se traducía en una mejoría en la SLP y SG, sentando las bases para el estudio ROBUST, un ensayo aleatorizado de fase 3 en el que se incluyeron 570 pacientes del subtipo ABC determinado mediante perfiles de expresión génica y estratificados por edad, IPI y enfermedad *bulky*. Este estudio no pudo demostrar ningún valor añadido de lenalidomida en la SLP (HR= 0.85, IC95%: 0.63-1.14, *P*= 0.29), aunque en el subgrupo de pacientes de alto riesgo (puntuación IPI de 3 a 5) se observó una tendencia favorable en el brazo de R²-CHOP⁵⁸.

El estudio CAVALLI⁵⁹, un ensayo fase 1b/2 mostró que la adición de venetoclax a R-CHOP aumentó significativamente la tasa de SLP a 2 años en pacientes con sobreexpresión de BCL-2 determinada mediante IHQ (78% vs. 62%; HR: 0.55, IC95%: 0.34-0.89) en comparación con un control histórico (estudio GOYA) a pesar de una mayor incidencia de toxicidad hematológica, principalmente neutropenia. El estudio SMART-START⁶⁰, un ensayo fase 2 unicéntrico en el que se incluyeron 60 pacientes con LDCGB no centrogerminal (determinado por IHQ), combinó dos ciclos de rituximab, lenalidomida e ibrutinib seguido de seis ciclos de R-CHOP o R-EPOCH. La tasa de respuesta global tras los dos primeros ciclos fue del 86.2% (IC95%: 74.6~93.9) y tras la finalización del tratamiento del 100% (IC95%: 93.5~100%), con una tasa de respuesta completa del 94.5% (IC95%: 84.9~98.9%).

Polatuzumab-vedotin es un anticuerpo conjugado dirigido contra CD79b, una molécula asociada al complejo del receptor de células B. Una vez internalizado, libera monometil auristatina E, un agente antimitótico que desencadena la apoptosis de la célula tumoral (**Figura 6**). El estudio POLARIX⁶¹, un ensayo clínico aleatorizado fase 3, comparó polatuzumab en combinación con rituximab, ciclofosfamida, doxorrubicina y prednisona frente a R-CHOP en pacientes con LDCGB con IPI ≥ 2 , demostrando una mejoría en la SLP en el brazo de polatuzumab (HR= 0.73, IC95%: 0.57–0.95; *P*= 0.02), aunque sin observar

diferencias en la tasa de respuesta global ni en la SG. En el análisis por subgrupos, los hombres mayores (> 60 años) con IPI de alto riesgo (3-5 puntos) parecen beneficiarse particularmente de la adición de polatuzumab, así como los pacientes del subtipo ABC. De esta forma, polatuzumab se ha convertido en el primer fármaco en combinación con inmunoquimioterapia en demostrar diferencia en la SLP y en obtener la aprobación por la EMA para el tratamiento de pacientes con LDCGB en primera línea.

Los anticuerpos biespecíficos, CD3-CD19 y CD3-CD20, también se encuentran en estudio en el tratamiento de primera línea asociado a la inmunoquimioterapia, con varios ensayos clínicos fase 1b/2 en marcha⁶² (**Figura 6**). Recientemente se han reportado los resultados preliminares en 56 pacientes tratados con glofitamab + R-CHOP en primera línea, con una tasa de respuestas globales del 83.6% (IC95%: 71.2-92.2%), de las cuales el 72.7% (IC95%: 59-83.9%) correspondieron a RC, con un perfil de seguridad adecuado con efectos adversos grado ≥ 3 en 40 (71.4%) pacientes, de los cuales 13 fueron en relación directa con glofitamab (23.2%)⁶³.

2.5.1 Tratamiento de rescate

La quimioterapia de rescate seguida de un trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos (TASP) sigue siendo el tratamiento estándar para aquellos pacientes con LDCGB refractario o en recaída (R/R) candidatos a trasplante y con enfermedad quimio-sensible. Los regímenes de rescate más frecuentemente utilizados son aquellos basados en platinos e incluyen R-DHAP (rituximab, dexametasona, citarabina en dosis altas y cisplatino), R-ICE (rituximab, ifosfamida, carboplatino y etopósido) y R-GDP (rituximab, gemcitabina, dexametasona y cisplatino), mostrando una eficacia similar en ensayos aleatorizados. Sin embargo, sólo el 25 a 35% de los pacientes pueden considerarse curados tras el TASP^{6,7}.

Tabla 7. Selección de estudios en el tratamiento de primera línea del LDCGB. (Modificada de Senh L & Salles G⁶)

Autor	Esquema evaluado	Población a estudio	Resultado	P
Cunningham⁴³ N= 1080	R-CHOP-14 vs. R-CHOP-21	>18 años, estadio IA*/IB -IV	SLP 2 años: 75% vs.75% SG 2 años: 83% vs. 81%	0.37 0.59
Delarue⁴⁴ N= 602	R-CHOP-14 vs. R-CHOP-21	60-80 años, aalPI ≥1	SLP 3 años: 56% vs.60% SG 3 años: 69% vs. 72%	0.76 0.74
Stiff⁴⁵ N= 370	R-CHOPx5 + TASP vs. R- CHOPx8	15-65 años, aalPI= 2-3	SLP 2 años: 69% vs.55% SG 2 años: 74% vs. 71%	0.005 0.30
Cortelazzo⁴⁶ N=246	R-HDS + TASP vs. R-CHOP-14	18-65 años, estadio II*-IV, aalPI=2-3 o IPI 3-5	SLP 3 años: 65% vs 62% SG 3 años: 77% vs 74%	0.83 0.64
Vitolo (GOYA)⁴⁸ N=1418	Obinutuzumab- CHOP vs. R- CHOP	≥18 años, aalPI≥2, o IPI=1 y edad ≤60, o IPI=0 y bulky ≥7.5cm	SLP 3 años: 70% vs. 67% SG 3 años: 81% vs. 81%	0.38 0.98
Thieblemont⁴⁹ N=650	Mantenimiento con lenalidomida tras R-CHOP	60-80 años, RP o RC tras 6-8 ciclos R- CHOP	SLP 2 años 80% vs. 75% SG 2 años 87% vs. 89%	0.01 0.26
Bartlett⁵¹ N= 491	DA-EPOCH-R vs. R-CHOP	≥18 años Estadio II-IV	SLP 2 años: 79% vs. 76% SG 2 años 87% vs. 86%	0.65 0.64
Recher⁵² N=380	R-ACVBP vs. R-CHOP	18-59 años, aalPI=1	SLP 3 años: 87% vs. 73%, SG 3 años: 92% vs. 84%	0.002 0.007
Davies (REMoDL-B)⁵³ N= 918	Bortezomib-R- CHOP vs. R- CHOP	≥18 años, estadio I*- IV; LDCGB no GCB	SLP 30 meses: 74% vs. 70% SG 30 meses: 83% vs. 82%	0.28 0.52
Younes (PHOENIX)⁵⁴ N=838	Ibrutinib-R- CHOP vs. R-CHOP	≥18 años, estadio II- IV, R-IPI≥1, LDCGB no GCB x IHC	SLP 3 años: 70% vs 67% SG 3 años: 83% vs 81%	0.50 0.95
Nowakowski (ROBUST)⁵⁸ N=570	Lenalidomide- R-CHOP vs. R- CHOP	≥18 años, estadio II- IV, IPI≥2, LDCGB no GCB x NanoString	SLP 2 años: 67% vs 64% SG 2 años 79% vs 80%	0.29 0.64
Morschhauser (CAVALLI)⁵⁹ N= 56	Venetoclax-R- CHOP vs. R- CHOP	18-80 años, IPI≥2, ECOG ≤2	SLP 2 años: 80% vs 67% SG 2 años 86% vs 81%	NA NS
Tilly (POLARIX)⁶¹ N= 879	Pola-R-CHP vs. R-CHOP	18-80 años, IPI≥2, ECOG ≤2	SLP 2 años: 77% vs 70% SG 2 años 89% vs 89%	0.02 0.75

IA*= estadio Ann Arbor IA con enfermedad bulky > 10cm

En la práctica clínica, más de la mitad de los pacientes no serán candidatos a un TASP debido a su estado general, edad o comorbilidad asociada. Los regímenes con un perfil de efectos secundarios aceptable, como R-GemOx (rituximab, gemcitabina y oxaliplatino), se ha utilizado con frecuencia en este subgrupo de pacientes. En un estudio fase 2 en el que se incluyeron 49 pacientes con LDCGB R/R no elegibles para trasplante, de los cuáles el 63% de los pacientes habían sido tratados previamente con rituximab, la tasa de SG a 5 años de los pacientes tratados con R-GemOx fue solo del 14%^{64,65}

Polatuzumab-vedotin se ha incorporado al arsenal terapéutico de pacientes no candidatos a TASP con resultados favorables. En un estudio fase 2 en el que se incluyeron 80 pacientes que fueron aleatorizados a la combinación de polatuzumab, rituximab y bendamustina frente a rituximab y bendamustina, la adición de polatuzumab mejoró significativamente tanto la SLP como la SG, con una mediana de duración de la respuesta 12.6 meses en el brazo de polatuzumab en comparación con 7.7 meses del grupo control⁶⁶.

Otro anticuerpo conjugado que ha mostrado una actividad prometedora en el tratamiento de pacientes con LDCGB R/R es loncastuximab-tesirina (ADCT-402), un anticuerpo anti-CD19 asociado a pirrolobenzodiazepina. En un estudio fase 2 completado recientemente que incluyó 145 pacientes con LDCGB R/R, casi la mitad de los pacientes mostraron respuesta, de las cuales el 24.1% fueron RC. Loncastuximab-tesirina está actualmente aprobado por la EMA (*European Medicines Agency*) para el tratamiento de pacientes tratados previamente con al menos dos líneas^{65,67}.

Tafasitamab, un anticuerpo anti-CD19, en combinación con lenalidomida ha sido aprobado por la EMA para pacientes con LDCGB R/R no elegibles para trasplante. Su aprobación se basa en el ensayo L-MIND en el que la combinación de tafasitamab y lenalidomida se administró hasta 12 ciclos cada 28 días, seguido de mantenimiento con tafasitamab en monoterapia hasta la progresión. El 60% de los pacientes (48/80) mostraron una respuesta objetiva con un 43% de RC, con una mediana de duración de la respuesta de 43.9 meses y una mediana de SG de 33.5 meses. Es de destacar que en el estudio no se incluyeron pacientes primariamente refractarios, así como pacientes con

reordenamiento de *MYC* y *BCL2* y/o *BCL6*, seleccionando un grupo de mejor pronóstico^{65,68}.

La terapia de células CAR-T (Chimeric antigen receptor T-cell) ha representado un cambio de paradigma importante en el manejo de los pacientes R/R, contando actualmente con 3 productos aprobados para el tratamiento del LDCGB R/R después de ≥ 2 líneas de tratamiento sistémico o tras la recaída posterior a un TASP. La eficacia y seguridad de axicabtagene ciloleucel (axicel) se probaron en el ensayo multicéntrico en fase 2 ZUMA-1, el 82% de los pacientes mostró una respuesta objetiva y el 54% alcanzó una RC⁶⁹. En un estudio de seguimiento a largo plazo, la SG a 3 años se mantuvo en el 47%, con una mediana de SG de 25.8 meses⁷⁰. El estudio JULIET⁷¹ evaluó la eficacia de tisagenlecleucel (tisacel), en el que se observó una tasa de respuesta global del 52%, con un 40% de RC. Hasta la última actualización publicada⁷², la mediana de duración de la respuesta no se había alcanzado con una mediana de seguimiento de 40.3 meses, y se estimó que el 60.4% de los pacientes mantuvieron la respuesta a los 36 meses. Por otro lado, lisocel, el tercer producto, mostró una tasa de respuesta global del 73%, con un 53% de RC, y una mediana de SLP)de 6.8 meses en el estudio TRANSCEND, que incluyó a 256 pacientes con linfoma difuso de células grandes B (LDCGB) R/R. Tras una mediana de seguimiento de 12 meses, la mediana de duración de la respuesta aún no se había alcanzado⁷³.

En un estudio retrospectivo se ha observado que el 49% de las recaídas tras el tratamiento con células CAR-T ocurren en el primer mes después de la infusión. Los factores de riesgo asociados a una progresión temprana fueron la afectación de ≥ 2 sitios extranodales, niveles elevados de proteína C reactiva y un VMT alto⁷⁴. Es importante destacar que el tratamiento con células CAR-T conlleva diferentes efectos tóxicos que pueden influir en la selección de los pacientes candidatos a esta terapia. La incidencia del síndrome de liberación de citoquinas de grado 3/4 oscila entre el 2% y el 22%, mientras que la toxicidad neurológica puede afectar a un 10-28% de los pacientes⁶⁵.

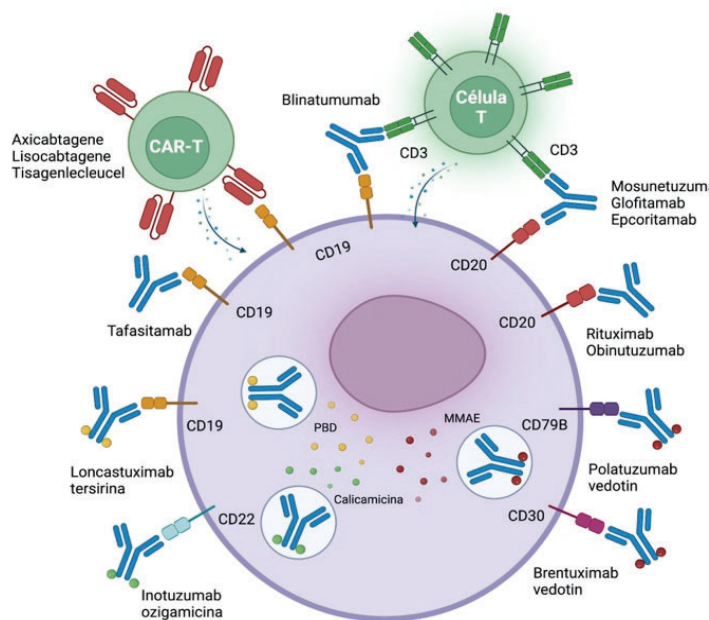
La terapia con células CAR-T se comparó prospectivamente contra el tratamiento estándar en pacientes con LDCGB refractarios o en recaída dentro de los 12 meses posteriores a la primera línea de tratamiento. En el ensayo

ZUMA-7 se incluyeron 180 pacientes tratados con axicabtagene ciloleucel y 179 pacientes asignados al grupo control, objetivándose una respuesta en el 83% de los pacientes del brazo de axicel y del 50% en el grupo control, con una tasa de RC del 65% y 32%, respectivamente. La tasa de SLE a 2 años fue del 41% en el grupo de axicel frente al 16% en el grupo control (HR 0.4, IC95%: 0.31-0.51; $P < 0.001$). La SG a dos años fue del 61% en comparación con el 52% en el grupo control⁷⁵. En el ensayo TRANSFORM, 184 pacientes fueron asignados aleatoriamente al grupo de tratamiento estándar con terapia de rescate seguida de TASP o al grupo de terapia con lisocabtagen maraleucel. Los pacientes que recibieron lisocel mostraron una ORR del 86% en comparación con el 48% del grupo control. La SLE fue significativamente mejor para los pacientes del grupo de células CAR-T, siendo de 10.1 meses en comparación con 2.3 meses en el grupo control (HR 0.349, $p < 0.0001$). La mediana de SG no se había alcanzado en el grupo de lisocel frente a 16.4 meses en el grupo de tratamiento estándar⁷⁶. Además, el ensayo BELINDA evaluó el papel de tisagenlecleucel en la terapia de segunda línea, incluyendo a 322 pacientes que fueron aleatorizados entre terapia de rescate seguida de TASP o a tisagenlecleucel. La tasa de respuesta global fue del 46.3% en los pacientes tratados con tisagenlecleucel en comparación con el 42.5% de los pacientes asignados al grupo del TASP. La mediana de SLE fue de 3 meses en ambos grupos de tratamiento (HR 1.07, $P = 0.61$)⁷⁷. Los resultados alentadores de los ensayos ZUMA-7 y TRANSFORM indican que la terapia con células CAR-T podría convertirse en el nuevo estándar para el tratamiento de pacientes con LDCGB R/R que recaen precozmente después de la inmunoterapia⁶⁵.

En ensayos clínicos se están investigando otras formas de inmunoterapia, como los anticuerpos biespecíficos, los cuales se unen simultáneamente a las células tumorales y a las células efectoras del sistema inmunológico (células T, macrófagos o células NK), activando así la respuesta inmunitaria y provocando la eliminación de las células tumorales (**Figura 6**). Aunque los resultados preliminares como monoterapia son prometedores, con tasas de respuesta global y RC muy altas, se necesitan datos más sólidos para evaluar su eficacia, especialmente en combinación con la inmunoterapia (**Tabla 8**)⁷⁸.

Uno de estos anticuerpos biespecíficos, glofitamab, ha mostrado resultados prometedores en un ensayo de fase 2 que incluyó a 155 pacientes con LDCGB R/R, incluyendo 52 pacientes que habían recibido previamente terapia con células CAR-T. Después de una mediana de seguimiento de 12.6 meses, el 39% de los pacientes alcanzaron la RC, con una SLP a los 12 meses del 37% (IC95%: 28 a 46%). El síndrome de liberación de citoquinas fue el efecto adverso más común y la discontinuación de glofitamab debido a eventos adversos ocurrió en el 9% de los pacientes⁷⁹.

Otro anticuerpo biespecífico, epcoritamab, ha mostrado excelentes resultados en monoterapia con una tasa de respuestas globales del 63% (39% de ellas RC) y una duración mediana de la respuesta de 12 meses, así como una mediana de SLP de 4.4 meses (IC95%: 3.0 a 7.9), sin alcanzarse entre los que lograron una RC, y sin haberse alcanzado la mediana de SG⁸⁰. Además, también se han reportado resultados prometedores en combinación con R-DHAX en 19 pacientes con LDCG R/R candidatos a trasplante, con un 100% de respuestas globales, de las cuales el 86% correspondieron a RC y sin alcanzar aún la mediana de duración de la respuesta, SLP y SG⁸¹.



MMAE: monometil auristatina E; PBD: pirrolobenzodiazepinas

Figura 6. Principales antígenos diana de las células CAR-T y anticuerpos utilizados en el tratamiento del LDCGB.

Tabla 8. Principales ensayos con anticuerpos biespecíficos utilizados en el LDCGB R/R

ANTICUERPO	FASE	ORR	RC	MEDIANA SLP	MEDIANA DOR	PRINCIPALES EFECTOS SECUNDARIOS
Blinatumomab CD19/CD3 ⁸²	2 N=21	43 (27-44)	19 (13-27)	3.7 (1.4-2.9)	13.5 (5.6-22.8)	Grado ≥3: eventos neurológicos (22%), leucopenia (17%), trombocitopenia (17%), neumonía (13%)
Mosunetuzumab CD20/CD3 ⁸²	1/1b N=129§	35 (27-44)	19.4 (13-27)	1.4 (1.4-2.9)	7.6 (5.6-22.8)	Grado ≥3: neutropenia (25%), hipofosfatemia (15%), anemia (9%), CRS (1%)
Glofitamab ⁷⁹ CD20/CD3	2 N=155	52 (43-60)	39 (32-48)	4.9 (3.4-8.1)	18.4 (13.7-NA)	Grado ≥3: neutropenia (27%), trombocitopenia (8%), anemia (6%), CRS (4%)
Epcoritamab ⁸⁰ CD20/CD3	1/2 N=157	63.1 (55-70)	38.9 (31-47)	4.4 (3.0-7.9)	12.0 (6.6-NE)	Grado ≥3: neutropenia (15%), anemia (10%), trombocitopenia (6%), CRS (2.5%)
Epcoritamab + R-DHAX ⁸¹	1/2 N=29	100	86	NA	NA	Grado ≥3: trombocitopenia (59%), neutropenia (44%), anemia (17%), CRS (0%)
Odroneixtamab CD20/CD3 ⁸³	2 N=140	50 (35-62)	36 (35-62)	4.4 (3.4-5.6)	10.2 (6.3-NE)	Cualquier grado: CRS (55%; grado ≥3: 4%), anemia (42%), pirexia (39%), neutropenia (28%)
Mosunetuzumab + Polatuzumab ⁸⁴	1/2 N=60	65 (52-77)	48 (35-62)	8.9 (3.5-NE)	NA (6.3-NE)	Cualquier grado: CRS (18%; grado ≥3: 8%), Infección grave (13%), neutropenia (33%)

§ Incluye pacientes con diversas histologías de LNH agresivo; OOR: Tasa de respuesta objetiva; RC: respuesta completa; SLP: Supervivencia libre de progresión; DOR: duración de la respuesta; NE: no estimable; NA: No alcanzada; DHAX: Rituximab, dexametasona, citarabina y oxaliplatino

3. LINFOMA DE CÉLULAS B PRIMARIO DE MEDIASTINO

3.1 Definición y epidemiología

El linfoma de células B primario de mediastino (LPM) es un linfoma agresivo que representa del 2 al 3% de los casos de linfoma. Inicialmente se consideró un subtipo de LDCGB en la REAL (Revised European American Lymphoma Classification) pero, debido a sus características clínico-patológicas distintas, es reconocido como una entidad distinta desde la cuarta edición de la clasificación la Organización Mundial de la Salud de 2008¹. Esta distinción de otros subtipos de LDCGB se ha confirmado a nivel molecular utilizando perfiles de expresión génica, en los que se han observado una similitud con el linfoma de Hodgkin clásico⁸⁵. El linfoma de la zona gris de mediastino representa una entidad separada con características intermedias entre el LPM y el linfoma de Hodgkin (LH), y que para su diagnóstico requiere cumplir criterios morfológicos (una alta densidad de células tumorales) e inmohistoquímicos (una intensa expresión de ≥ 2 marcadores de células B)⁵.

3.2 Presentación clínica

El LPM se presenta generalmente en adultos jóvenes con una mediana de edad en torno a los 35 años, con una proporción mujer/hombre de 2:1. La sintomatología está en relación con la compresión causada por la masa mediastínica y puede incluir trombosis, disnea o síndrome de vena cava superior. La mayoría de los pacientes tienen enfermedad localizada al diagnóstico (estadio de Ann Arbor I o II), aunque pueden presentar extensión intratorácica al pulmón y/o a la pared torácica con derrame pleural/pericárdico asociados. La afectación de SNC o de la médula ósea es extremadamente rara, aunque puede observarse en la recaída⁸⁶.

3.3 Diagnóstico

La obtención de material histológico para establecer el diagnóstico a menudo representa un reto dada la localización de la enfermedad y la urgencia de iniciar tratamiento, requiriendo en muchas ocasiones la realización de una mediastinoscopia, un procedimiento quirúrgico torácico invasivo. Los riesgos de la mediastinoscopia incluyen sangrado, infección, parálisis temporal o permanente del nervio laríngeo, neumotórax, formación de adherencias, enfisema subcutáneo o perforación traqueal⁸⁷.

Morfológicamente, el LPM se componen de láminas de células medianas a grandes que se asemejan a centoblastos, centrocitos grandes o inmunoblastos, con citoplasma claro pálido que rodea núcleos ovalados a redondos (pleomórficos) que a veces se asemejan a las células Reed Sternberg (RS) del LH. Una de las características destacada es la formación de bandas fibrosas de colágeno que forman una esclerosis compartimentada. El inmunofenotipo se caracteriza por la expresión de marcadores de célula B como CD19, CD20, CD22 y CD79a y factores de transcripción como PAX5, OCT2 y BOB1. CD30 se expresa en >80% de los casos, pero muestra una tinción débil y heterogénea, a diferencia de LH, y la expresión de CD15 es negativa (**Figura 7**). CD23 se expresa en el 70% de los casos y PDL1/PDL2 se expresa en el 50-70% de los casos^{1,88}.

3.4 Factores pronósticos

No existe un modelo pronóstico específico para pacientes con LPM. Un estudio retrospectivo mostró que el índice de pronóstico internacional ajustado por edad (aaIPI) fue el único índice asociado de forma significativa con la SLP y SG⁸⁹. Aoki et al⁹⁰ concluyeron que la presencia de derrame pericárdico o pleural, una puntuación de IPI elevada y un ECOG > 1 se asociaron con una SG inferior. Otro estudio mostró que la afectación extranodal asociada a un valor de LDH elevado ≥ 2 veces el límite superior de la normalidad o la presencia de enfermedad voluminosa parece definir un subgrupo de alto riesgo con una tasa de mortalidad relacionada con el linfoma en torno al 20%⁹¹. El uso de parámetros cuantitativos

extraídos a partir del PET-CT parece ser de utilidad en la predicción de la respuesta al tratamiento. Así, el valor de SUVmax, el VMT y la GTL se han correlacionado con el pronóstico en los pacientes con LPM, siendo la GTL el mejor predictor con una SLP a 5 años del 64% frente al 99% en aquellos con GTL alto y bajo, respectivamente⁹².

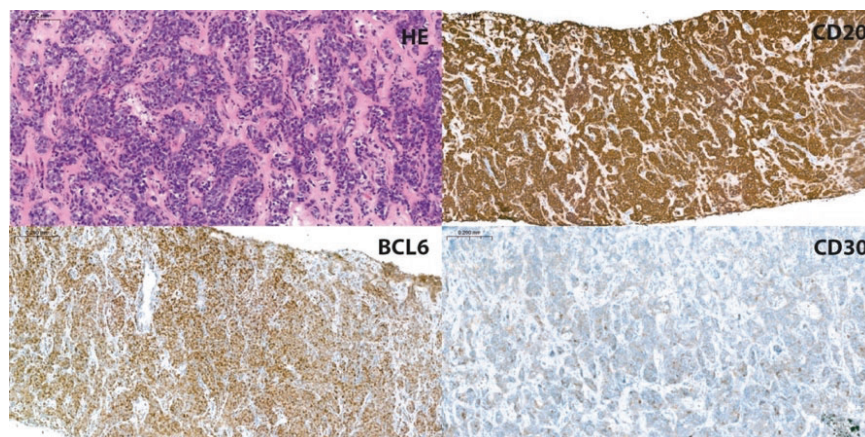


Figura 7. Características morfológicas e inmuohistoquímicas del LPM.

La tinción con hematoxilina y eosina (HE) ilustra el citoplasma claro de las células neoplásicas y las bandas fibróticas. Las células tumorales expresan CD20, BCL6 y la mayoría expresa CD30, que es débil y heterogéneo.

3.4.1

3.5 Alteraciones genéticas

El LPM tiene un perfil de expresión génica característico que ha permitido diferenciarlo del LDCGB. Los genes sobreexpresados en el LPM incluyen aquellos involucrados en la vía JAK/STAT (*IL13RA*, *JAK2* y *STAT1*), así como componentes clave de la activación de NF- κ B (*TRAF1* y *TFNAP3*), lo que apoya su relación con el LH^{86,93,94}. Mottok y colaboradores desarrollaron una herramienta para la clasificación molecular del LPM utilizando perfiles de expresión génica (Lymph3Cx) a partir de muestras de tejido fijado con formalina e incluido en parafina (FFPE), que incorpora 30 genes a los genes utilizados para determinar la célula de origen en LDCGB, 24 genes sobreexpresados en LPM y 6 genes en LDCGB, con un potencial desarrollo e integración en el diagnóstico de rutina y toma de decisiones terapéuticas⁹⁵.

Recientemente se publicaron dos series en los que se estudiaron las alteraciones genómicas en el LPM mediante la secuenciación del genoma completo (WGS), siendo los genes más recurrentemente mutados *SOC1*, *GNA13*, *STAT6*, *ITPKB*, *ACTB*, *TNFAIP3*, *ILR4*, *CIITA*, *B2M* y *NFKBIE*^{96,97}.

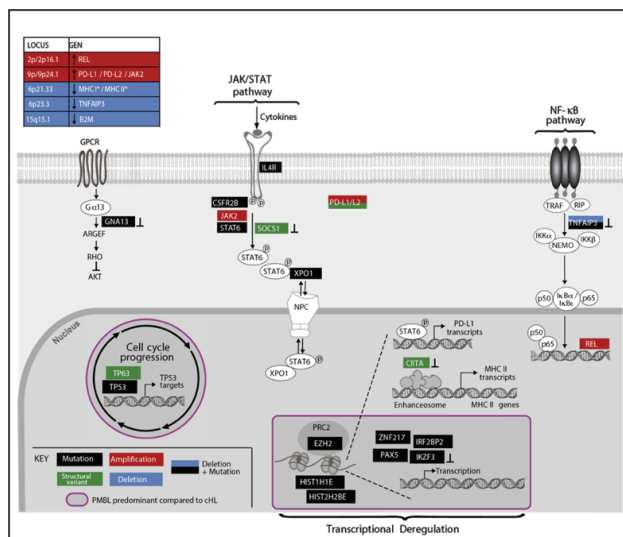


Figura 8. Vías de señalización implicadas en la patogénesis del LPM.

Otro mecanismo en la patogénesis del LPM es la alteración en la presentación de antígenos a través de defectos en el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). La regulación a la baja de las moléculas MHC-II se asocia a alteraciones genéticas en *CIITA*, presente en el 70% de los casos de LPM. Las mutaciones en β -2-microglobulina también son frecuentes en el LPM y conducen a una alteración de la presentación de antígenos mediada por MHC-I^{86,96,98}. Por último, mutaciones o deleciones en *CD58* afectan la interacción con las células NK y T⁸⁶ (**Figura 9**).

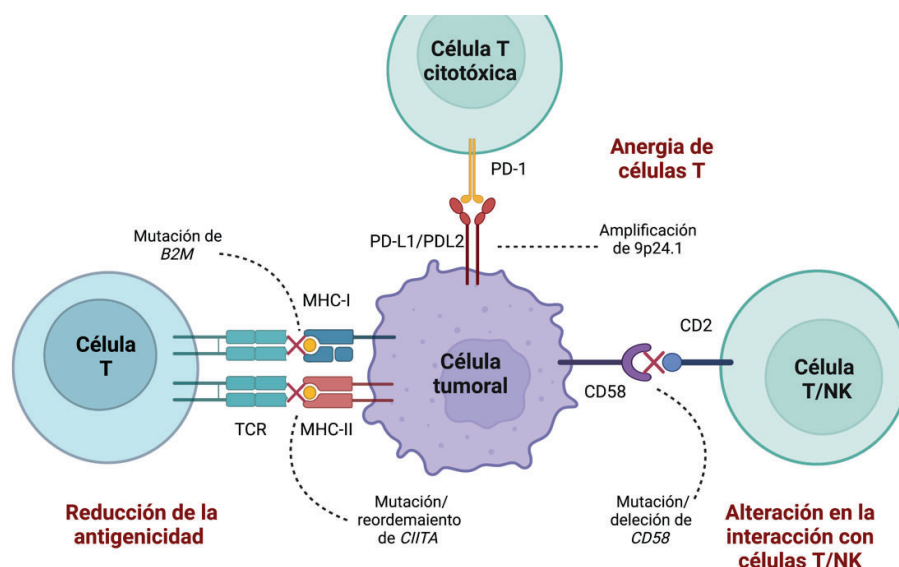


Figura 9. Mecanismos de evasión inmune en la patogénesis del LPM.

Estos incluyen la expresión de PDL1/2 con la consiguiente anergia de las células T, la reducción de la antigenicidad a través de la regulación a la baja del MHC tipo 2 (en parte, debido a los reordenamientos y mutaciones de *CIITA*), defectos en MHC tipo 1 causados por mutaciones de *B2M*, y mutaciones/delección de *CD58* que conducen a interacciones deficientes entre las células T y NK.

3.6 Tratamiento de primera línea

La falta de estudios aleatorizados limita que exista un consenso en el tratamiento de primera línea del LPM. Las principales controversias giran en torno a equilibrar la máxima tasa de curación frente a la mínima toxicidad a largo plazo, especialmente en esta población de pacientes jóvenes⁹⁹.

La adición de rituximab mejoró la SLP a 3 años en comparación con CHOP (78% frente a 52%; $P=0.012$), pero sin diferencias significativas en la SG (88.5% frente a 78.2%; $P=0.58$)^{99,100}. Sin embargo, esta diferencia no fue clara en los pacientes tratados con los esquemas MACOP-B (metotrexato, doxorubicina, ciclofosfamida, prednisolona, bleomicina) o VACOP-B (etopósido, doxorubicina, ciclofosfamida, prednisolona, bleomicina), donde la adición de rituximab asociado a radioterapia no demostraron diferencias significativas con la serie histórica tratada sin rituximab^{86,101}.

Dunleavy y colaboradores¹⁰² evaluaron el esquema intensivo DA-EPOCH-R en un ensayo fase 2 que incluyó 51 pacientes con LPM, obteniendo una SLE del 93% (IC95%: 81-98%) y una SG del 97% (IC95%: 81-99%), con solo 2 (4%) pacientes que requirieron radioterapia de consolidación. Sin embargo, en población pediátrica los datos son contradictorios. En un estudio multicéntrico fase 2 que incluyó 46 pacientes pediátricos, DA-EPOCH-R mostró una SLE a 2 años del 69% (IC95%: 52–82%) y una SG del 82% (IC95%: 67–91%), lo que sugiere que DA-EPOCH-R no es superior al tratamiento convencional en niños. Estudios retrospectivos han comparado los resultados de la terapia con DA-EPOCH-R y R-CHOP asociado a radioterapia en LPM con resultados ambiguos⁸⁶. En el estudio fase 3 CALGB 50303 que comparó DA-EPOCH-R contra R-CHOP como tratamiento de primera línea en pacientes con LDCGB, se incluyeron 35 pacientes con LPM, y ni se pudo mostrar un beneficio del régimen intensivo, siendo la SLP similar para ambos grupos⁵¹.

El LPM es una enfermedad radiosensible y la radioterapia continúa jugando un papel importante pero controvertido en el tratamiento, especialmente para aquellos en remisión completa. Los estudios retrospectivos han mostrado resultados contradictorios y están sujetos a sesgos causados por criterios de inclusión variables, y a que la radioterapia no se administró con criterios uniformes^{86,99}. Un análisis retrospectivo de 426 pacientes en el *National Cancer Database* observó una SG a 5 años superior para los pacientes que recibieron radioterapia tras el tratamiento quimioterápico en comparación con los que no lo hicieron (93% vs. 83%, respectivamente)¹⁰³. Recientemente dos estudios retrospectivos han demostrado la utilidad de un PET negativo al finalizar el

tratamiento con R-CHOP o R-MACOP-B para detectar pacientes que pueden obviar la radioterapia, sin encontrar diferencias con aquellos pacientes con PET positivo (Douville score 4 y 5) que si la recibieron^{104,105}.

3.7 Tratamiento de rescate

La enfermedad refractaria y la recaída tras el tratamiento inicial se asocia a un mal pronóstico. La recaída generalmente ocurre dentro de los 12 meses, se presenta con una extensión más diseminada que puede afectar al SNC. Las recaídas tardías son muy poco frecuentes. El tratamiento estándar incluye la inmuoquimioterapia de rescate seguida de dosis altas quimioterapia y TASP, similar al LDCGB. Los regímenes de inmuoquimioterapia de rescate incluyen R-DHAP, R-ICE y R-GDP^{86,99}. En un estudio inicial que incluía mayoritariamente pacientes tratados en la era pre-rituximab, solo el 22% de los 37 pacientes con LPM R/R obtuvieron una respuesta suficiente como para proceder al TASP, con una SG a los 2 años del 15%¹⁰⁶. En cambio, un reciente estudio con 51 pacientes demostró una tasa de trasplante del 85%, con una SLP y SG a 3 años de 57% y 61% respectivamente, con tasas sólo ligeramente mejores en aquellos que se sometieron a trasplante (60% y 65%, respectivamente)¹⁰⁷.

El estudio pivotal fase II KEYNOTE-17 evaluó la eficacia de pembrolizumab (200 mg cada 3 semanas durante un máximo de 35 ciclos o hasta 2 años) en pacientes con LPM R/R que habían recibido al menos 2 líneas de tratamiento previas o no eran candidatos a TASP. La tasa de respuesta global fue del 45%, con una tasa de RC del 13%. Tras una mediana de seguimiento de tres años y medio, se observó una mediana de SLP de 5,5 meses y una mediana de SG de 22,3 meses, con una duración de respuesta no alcanzada (rango 1,1-46,9 meses). Los eventos adversos relacionados con el tratamiento de grado 3/4 ocurrieron en el 23% de los pacientes, siendo la neutropenia el efecto adverso más común (13,5%)¹⁰⁸. Estos datos llevaron a la aprobación de pembrolizumab por parte de la *Food and Drug Administration* para el tratamiento de pacientes adultos y pediátricos con LPM R/R después de 2 o más líneas de tratamiento, aunque no obtuvo la aprobación de la EMA.

Brentuximab-Vedotin (BV) es un anticuerpo conjugado dirigido contra el antígeno CD30, presente en alrededor del 80% de los casos de LPM. Un estudio de fase II (NCT02423291) evaluó la eficacia y la seguridad de BV en monoterapia en pacientes con LPM R/R incluyendo 15 pacientes de los cuales 11 (73%) progresaron rápidamente, lo que resultó en el cierre prematuro del ensayo. La combinación de nivolumab con BV se estudió en el ensayo Check-Mate 436, que incluyó una cohorte de pacientes con LPM R/R, obteniendo una tasa de respuestas globales del 73% y de RC del 37%, lo que refleja la sinergia potencial de la terapia con inhibidores de PD1 combinada con otros agentes sistémicos, ya sean agentes dirigidos o poliquimioterapia.

Al igual que en el LDCGB, la terapia con células CAR-T está aprobada para el tratamiento de paciente con LPM R/R tras dos líneas de tratamiento. El estudio ZUMA-1 incluyó 8 pacientes con LPM, y en el análisis inicial agrupado con pacientes con linfoma folicular transformado, la tasa de respuesta global fue del 71%, de las cuales el 12% fueron RC. En un estudio en vida real con 33 pacientes tratados en cinco centros estadounidenses que recibieron axi-cel entre 2018 y 2019, la tasa de respuesta completa fue del 78%, con un 69% de RC y SLP y SG a 2 años del 64% y el 78%, respectivamente.

4. LINFOMA DE CÉLULAS GRANDES B TESTICULAR

4.1 Definición y epidemiología

El linfoma testicular es un linfoma extranodal poco frecuente que representa el 1-9% de las neoplasias testiculares y el 1-2% de todos los linfomas. El subtipo histológico más común es el linfoma de células grandes B (TLBCL)¹⁰⁹. El TLBCL presenta un tropismo extranodal claro, con infiltración al testículo contralateral y el SNC¹¹⁰, ambas ubicaciones consideradas santuarios inmunológicos debido a la presencia de la barrera hematotesticular y hematoencefálica, que pueden conducir a una reducción en las concentraciones de agentes de quimioterapia y a la evasión de las respuestas antitumorales del huésped y de hecho, en la última edición de la clasificación de neoplasias linfoides de la OMS, se han agrupado ambos en una nueva categoría: Linfoma de células B grandes primario de sitios inmunes privilegiados⁴. Así mismo, en el consenso internacional, el TLBCL se ha reconocido como una entidad distinta al LDCGB⁵.

4.2 Presentación clínica, diagnóstico y estadaje

La mediana de edad al diagnóstico se sitúa entre los 65 y 71 años. Generalmente se presenta como una masa testicular firme e indolora y hasta un 40% puede asociarse a hidrocele, siendo poco frecuente la afectación bilateral sincrónica (6% a 10% de los casos)¹⁰⁹. Los síntomas B son raros y ocurren principalmente en el caso de enfermedad diseminada¹¹¹. La mayoría de los casos presenta enfermedad localizada al diagnóstico, pero hasta un 20-30% de los pacientes puede presentar enfermedad diseminada, siendo prácticamente indistinguible del LDCGB nodal con afectación testicular^{112,113}. El TLBCL tiene una alta tasa de recaída, con mayor frecuencia a nivel del testículo contralateral y del SNC que se asocia a un pronóstico especialmente sombrío^{110,114}.

Las modalidades de imagen que pueden ayudar en el diagnóstico incluyen la ultrasonografía, en el que se observa el testículo agrandado con áreas focales o difusas de hipoecogenicidad e hipervascularidad y la resonancia magnética en la que se observa hipointensidad en T2 y fuerte realce heterogéneo de gadolinio,

además de que permite la evaluación simultánea de ambos testículos, espacios paratesticulares y el cordón espermático^{109,115,116}. La orquiectomía radical mediante abordaje inguinal está indicada para lograr un control óptimo de la enfermedad y la obtención de una adecuada muestra para el diagnóstico. La estadificación recomendada es la misma que para otras formas de LNH agresivo que incluye PET-CT y biopsia de médula ósea, con la adición de una estadificación específica del SNC con punción lumbar para el análisis del líquido cefalorraquídeo y resonancia magnética cerebral^{110,114}.

4.3 Patología, características moleculares y alteraciones genéticas

El TLBCL, como el LDCGB, se caracteriza por células medianas o grandes que tienen un tamaño nuclear igual o superior a los núcleos de macrófagos o más del doble del tamaño de un linfocito normal, con un patrón de crecimiento difuso (**Figura 10**). Las células neoplásicas típicamente expresan marcadores de células B como CD19, CD20, CD22, CD79a y PAX5. Bcl-2 se expresa en el 70% de los casos, pero BCL6 rara vez es positivo. El índice proliferativo evaluado con MIB1 se encuentra en torno del 40%^{109,113,117}. La frecuencia de los reordenamientos de *BCL2* y *MYC* es comparable a la del LDCGB-ABC (alrededor del 10% y 15%, respectivamente), mientras que los reordenamientos de *BCL6* parecen menos comunes en el TLBCL (alrededor del 40% y 60%, respectivamente)¹¹³.

El 60 a 96% de los casos representan un fenotipo ABC/no GCB. La variación en la frecuencia depende de la proporción de pacientes con enfermedad en estadio avanzado incluidos y el algoritmo de IHQ utilizado^{109,118–120}. En las series publicadas, el 6% al 36% de los casos son CD10+, pero muchos de ellos también expresan MUM1, correspondiendo a un fenotipo ambiguo. Booman y cols¹²⁰ determinaron la COO utilizando tanto IHQ como perfiles de expresión génica. Por IHQ, el 36% (8/22) se clasificaron como fenotipo ambiguo (CD10, Bcl-6+/-, MUM1+), de los cuales 7/8 (88%) se reclasificaron como tipo ABC mediante análisis de expresión génica.

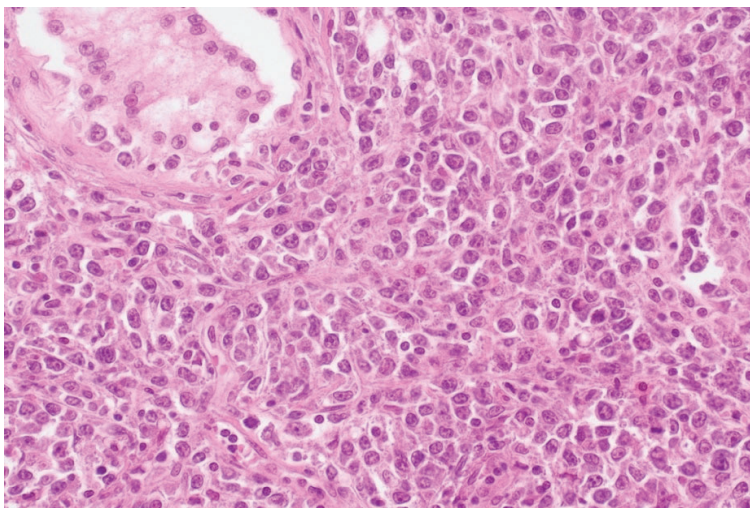


Figura 10. Características morfológicas del TLBCL.

La tinción con hematoxilina/eosina (HE) a 40x ilustra el patrón de crecimiento difuso.

La mayoría de los casos de TLBCL se agrupan dentro de los subtipos moleculares MCD y C5, con mutaciones frecuentes de *CD79B* y *MYD88^{L265P}*, que conducen a la señalización oncogénica y la activación constitutiva de la vía NF- κ B, lo que finalmente da como resultado una mayor supervivencia y proliferación celular^{20,22} (**Figura 11**). Kraan y colaboradores¹²¹ evaluaron 37 pacientes con TLBCL encontrando la mutación de *MYD88^{L265P}* en 25 (68%) y *CD79B* en 7 (19%) de los 37 casos. Entre los mecanismos que favorecen la evasión inmune en el TLBCL, y también observados en el linfoma difuso de células de células grande B primario del sistema nervioso central (PCNSL), se incluyen las alteraciones en el número de copias y las translocaciones de 9p24.1 que dan como resultado una mayor expresión de las proteínas PD-L1/L2, así como la pérdida de genes *HLA*. Minderman et al¹²² evaluaron la expresión de HLA de clase I y II en 25 pacientes con TLBCL, encontrado una pérdida frecuente de la expresión de ambos (68% y 84% respectivamente). Recientemente, Chapuy et al¹²³ estudiaron las alteraciones genéticas del TLBCL y PCNSL observando con frecuencia inestabilidad genómica y una pérdida casi uniforme de *CDKN2A*, a menudo bialélica, siendo raras las mutaciones en *TP53*.

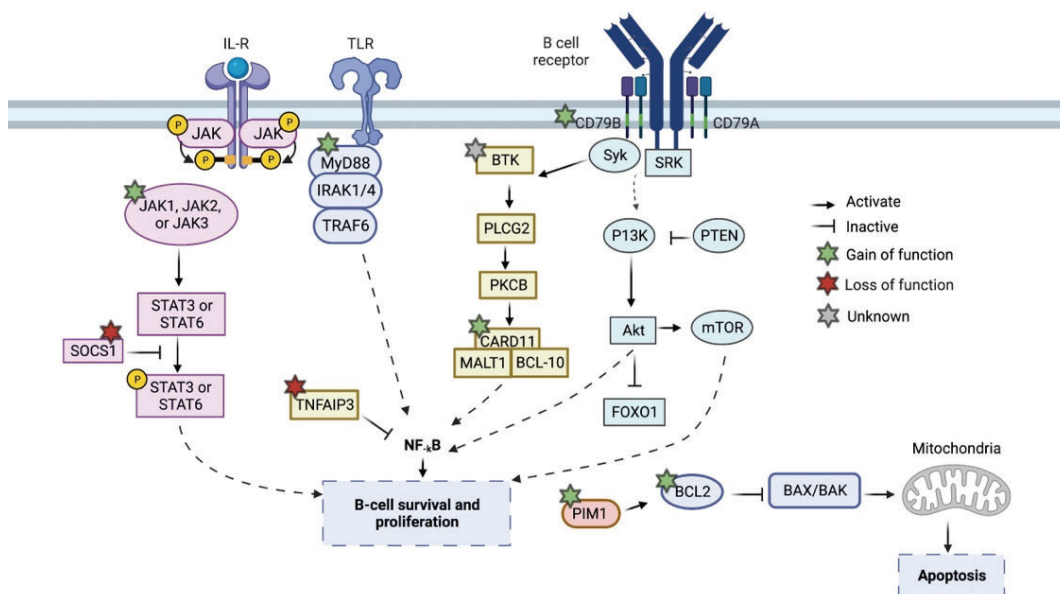


Figura 11. Alteraciones genéticas en las diferentes vías de señalización implicadas en la patogénesis del TLBCL.

4.4 Factores pronósticos

Se han descrito numerosos factores pronósticos, en gran parte derivados de pequeñas series retrospectivas, que a menudo incluyen pacientes que tenían enfermedad diseminada con afectación testicular¹⁰⁹. En un estudio en la era pre-rituximab, un ECOG bajo, la enfermedad localizada sin compromiso extranodal adicional, la ausencia de síntomas B y de una masa voluminosa, los niveles séricos normales de LDH y β 2-microglobulina, y un IPI favorable fueron las principales características clínicas asociadas con una mejor SLP y SG¹²⁴. En otro estudio¹¹¹, los predictores independientes de peor supervivencia fueron la edad avanzada, la enfermedad en estadio avanzado, la afectación del testículo izquierdo y los tratamientos que no incluyeron cirugía ni radiación.

4.5 Tratamiento

Además de alcanzar la remisión completa, el objetivo del tratamiento del TLBCL es prevenir la recaída en el testículo contralateral y en el SNC. Debido a la falta

de ensayos aleatorizados de fase III, las recomendaciones de tratamiento se basan en ensayos prospectivos de fase II y datos retrospectivos.

Avilés et al¹²⁵ evaluaron el esquema R-CEOP (rituximab, ciclofosfamida, epirrubicina, vincristina y prednisolona) asociado a radioterapia del testículo contralateral (30 Gy) y profilaxis del SNC con 4 ciclos de metotrexato intravenoso (6 g/m²). De los 38 pacientes incluidos, el 86% logró una RC, con una SLE y SG a 5 años del 70% y el 66%, respectivamente. El estudio multicéntrico de fase 2 IELSG-10 que incluyó 53 pacientes con TLBCL en estadio I/II evaluó el tratamiento con R-CHOP seguido de irradiación locorregional y metotrexato intratecal durante los primeros 2 ciclos de tratamiento, reportando un 98% de RC, con una SLP y la SG a 5 años del 74% y el 85%, respectivamente. La incidencia de recaída a nivel de SNC fue del 6% y no se observaron recaídas a nivel testicular¹²⁶.

No está definida con claridad cuál es la administración óptima de la terapia dirigida al SNC. Dado que muchas recaídas son parenquimatosas en lugar de leptomeníngeas y que la penetración en el parénquima cerebral y la distribución alrededor del neuroeje del metotrexato inyectado por punción lumbar es limitada, se prefiere el uso de dosis altas de metotrexato sistémico para lograr niveles más altos de fármaco en el parénquima cerebral^{109,113}.

Con base en estos datos, el estándar de tratamiento consiste en la orquiectomía seguida de inmuoquimioterapia con seis ciclos de R-CHOP o un régimen similar administrado cada 21 días, siendo la profilaxis del SNC, así como la irradiación del testículo contralateral, altamente recomendables¹¹³.

Los pacientes con TLBCL que experimentan una recaída tienen un mal pronóstico, probablemente debido a la alta frecuencia de recaídas en el SNC y la edad avanzada de los pacientes, que suele asociarse a comorbilidades que impiden tratamientos agresivos de rescate y/o TASP¹⁰⁹. Existen reportes de la utilidad de los nuevos tratamientos dirigidos con especial actividad en el LDCGB del subtipo ABC, como son los inhibidores del BCR y la lenalidomida. Yan et al¹²⁷ describieron el caso de un paciente con recaída a nivel de SNC tratado exitosamente con rituximab, ibrutinib y lenalidomida, mostrando una RC después del primer ciclo de tratamiento. El papel de los inhibidores de PD-1/PD-

L1 se ha evaluado dentro de un estudio con 5 pacientes con TLBCL o PCNSL refractarios tratados con nivolumab, observando una respuesta clínica y radiológica en todos los pacientes¹²⁸. Actualmente, un par de ensayos clínicos están explorando la eficacia de los inhibidores de PD-1/PD-L1 en el TLBCL (NCT03255018 y NCT02857426).

5. DNA CIRCULANTE

5.1 Generalidades

El DNA circulante (cfDNA) se conforma de fragmentos de DNA liberados por las células principalmente tras la necrosis y la apoptosis, y posiblemente también por secreción celular activa, siendo descrito por primera vez por Mandel y Metais en 1948^{129,130} (**Figura 12**).

Además del plasma o suero sanguíneos, el cfDNA se puede detectar en varios fluidos corporales, incluidos orina, saliva, líquido cefalorraquídeo, pleural y ascítico^{131,132}. La vida media en la circulación del cfDNA oscila entre 16 minutos y 2.5 horas^{133,134}. En condiciones fisiológicas, estos fragmentos se eliminan rápidamente de la circulación a través de la acción de nucleasas, excreción renal y absorción por el hígado y el bazo. La estabilidad de los fragmentos de cfDNA en la circulación puede aumentar a través de la unión a membranas celulares, vesículas extracelulares o proteínas.

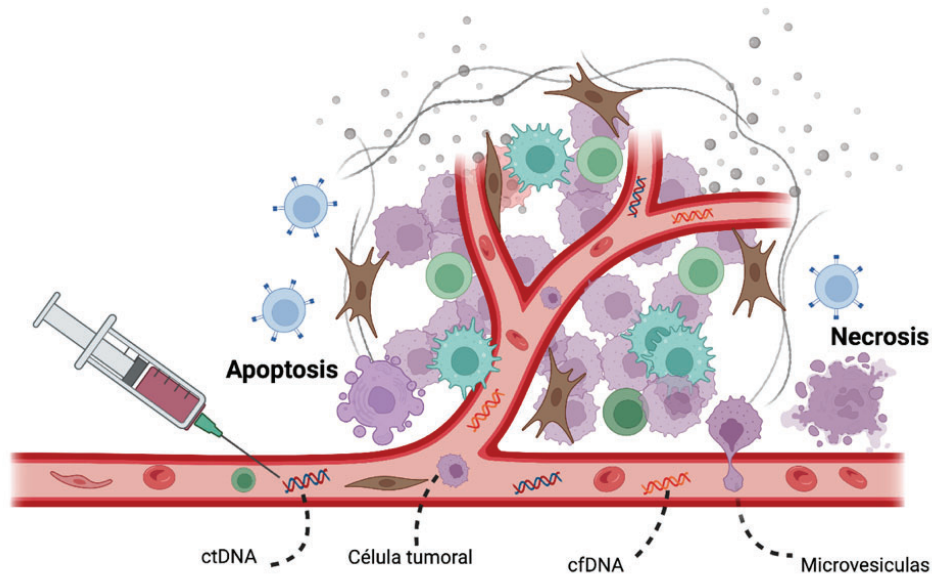


Figura 12. Fuentes de DNA circulante en plasma.

La tinción con hematoxilina/eosina (HE) a 40x ilustra el patrón de crecimiento difuso.

El cfDNA se caracteriza por tener una longitud en general inferior a 200pb y en individuos sanos la concentración en plasma oscila entre 1 y 10 ng/ml, aunque

ciertas situaciones fisiológicas como el embarazo o el ejercicio, o bien condiciones clínicas como infecciones, traumatismos o eventos vasculares isquémicos pueden elevar su concentración^{134,135}. De hecho, la identificación de secuencias de DNA fetal en plasma materno ha dado lugar a múltiples aplicaciones de cfDNA en medicina materno-fetal, entre ellos la determinación del sexo fetal, la identificación de trastornos monogénicos y aneuploidías¹³⁶.

Los pacientes con cáncer también presentan concentraciones más elevadas de cfDNA (5–1500 ng/mL), resultado de la liberación de cfDNA por las células neoplásicas, lo que se denomina DNA circulante tumoral (ctDNA)^{137,138}. En 1994, Sorenson y colaboradores¹³⁹ detectaron por primera vez mutaciones en *KRAS* utilizando el cfDNA proveniente del plasma de pacientes con cáncer de páncreas. En las últimas décadas, con el desarrollo de tecnologías basadas en secuenciación de nueva generación (NGS) se ha explorado la utilidad del ctDNA como marcador pronóstico y para la detección y caracterización genética de diferentes neoplasias, así como la monitorización de la dinámica tumoral durante el tratamiento, siendo posible su utilización para la determinación de la enfermedad mínima residual^{134,140,141}.

5.2 Consideraciones preanalíticas

La falta de consistencia entre los diversos protocolos para el manejo de muestras y las técnicas utilizadas para el análisis del ctDNA es uno de los principales obstáculos para trasladar el análisis a la práctica clínica habitual¹⁴². Por ello, en 2020 se publicó el primer consenso basado en la evidencia y la opinión de expertos por el *National Cancer Institute* de Estados Unidos, en el que se detalla los procedimientos para recolección y el procesamiento de las muestras para el análisis del cfDNA¹⁴³.

Actualmente se recomienda la utilización de plasma sobre el suero, resultado de varios trabajos en los que se utilizaron muestras pareadas y que compararon la concentración de cfDNA. Aunque en las concentraciones en suero son significativamente más elevadas, esto se debe a que, tras el proceso de coagulación, se favorece la lisis de los leucocitos conduciendo a la contaminación de la muestra por DNA genómico^{142,144,145}. Ello resulta en que, a

igualdad de copias mutantes, la fracción alélica será menor en suero que en plasma. Otra desventaja del suero respecto al plasma se refiere al hecho de que en el proceso de coagulación se pueden retirar porciones de cfDNA asociado a las partículas que se pueden unir a la fibrina y o el fibrinógeno ¹⁴⁶.

Las concentraciones del cfDNA y la contaminación con DNA genómico están muy influenciadas por el tipo de tubo de extracción utilizado. Los tubos de elección son los que contienen etilendiaminotetraacetato potásico (K2EDTA) como anticoagulante¹⁴⁷. Sin embargo, requiere un procesamiento de centrifugación y separación del plasma durante las primeras 2-4 horas tras la extracción de la sangre para evitar la lisis celular con la consiguiente contaminación con DNA germinal^{143,145}. Esto limita su aplicación únicamente a las muestras que se extraen en lugares muy próximos al laboratorio en donde se va a realizar el análisis. Se desaconseja el empleo de heparina ya que inhibe la polimerasa, lo que restringe bastante el uso posterior del cfDNA^{146,148}.

Cuando la separación inmediata del plasma no es posible, el uso de tubos estabilizadores reduce el efecto de la lisis celular, conservando la muestra de sangre durante 7 a 14 días, a temperatura ambiente y sin necesidad de centrifugación^{142,143,146}. En este grupo destacan los tubos Streck BCT, PAXgene cfDNA, Roche cfDNA, CellSave o Blood Exo DNA ProTeck, que han demostrado mantener concentraciones equivalentes de cfDNA cuando se compararon experimentalmente entre ellos¹⁴⁹⁻¹⁵³.

Los niveles de cfDNA en plasma no se ven afectados por la velocidad de centrifugación inicial, encontrándose concentraciones comparables de cfDNA obtenido tras una centrifugación inicial a velocidades entre 400-16000 g^{143,154}. Se recomienda como protocolo óptimo realizar un primer paso de centrifugación durante 10min a 1600g, luego proceder a la separación del plasma y, posteriormente, centrifugar este a 16 000g durante 5 minutos.^{142,143,155}

Una vez separado el plasma se recomienda almacenar a -80°C si no se va a realizar la extracción en los primeros 30 días, así como evitar los ciclos de congelación y descongelación de la muestra, ya que pueden interferir en su estabilidad^{143,146,156} (**Figura 13**).

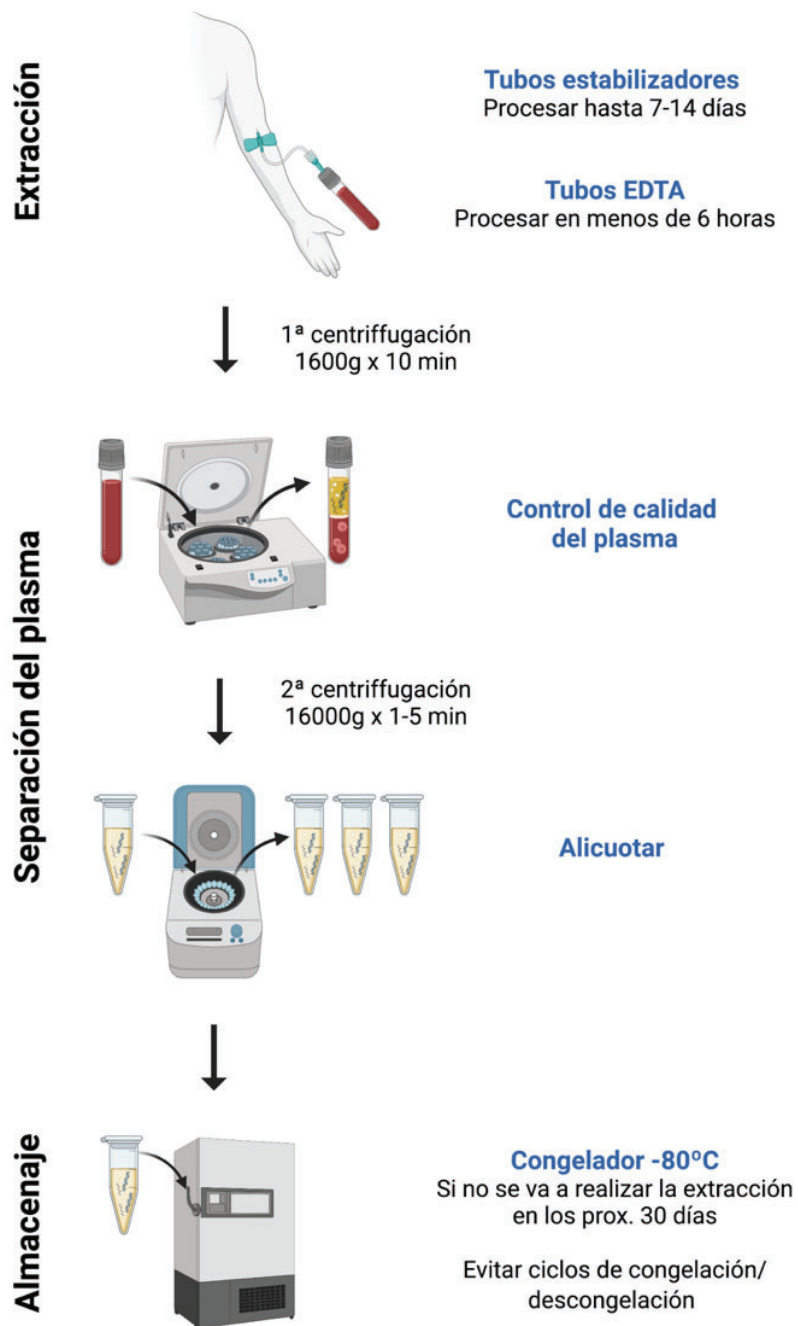


Figura 13. Procesamiento preanalítico de las muestras.

Para la extracción de cfDNA existen actualmente numerosos *kits* comerciales basados en tres metodologías: 1) intercambio aniónico, 2) unión a membranas de sílice o 3) unión a bolitas magnéticas recubiertas de sílice¹⁵⁰. Aunque la mayoría de los kits son eficientes y varios estudios sugieren que los resultados son comparables, algunos análisis han desmostado que la eficiencia de la extracción a partir de una misma muestra puede diferir en varios órdenes de magnitud¹⁴⁶. Así, por ejemplo, se ha observado que los métodos basados en membrana de sílice favorecen la extracción de fragmentos largos de cfDNA, mientras que los sistemas basados en bolas magnéticas son más eficientes recuperando fragmentos cortos, lo que podría causar un enriquecimiento de unas copias respecto a otras, causando variaciones en la fracción alélica^{146,157}. Tras la extracción se recomienda cuantificar y analizar la calidad del cfDNA. Para la cuantificación se pueden emplear métodos espectrofotométricos, fluorimétricos o de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa, siendo el más habitual y recomendable el método fluorimétrico. Es importante asegurarse de la muestra se encuentra libre de DNA genómico usando técnicas de electroforesis capilar o en microfluído, que permiten ver la distribución de tamaños de los fragmentos de DNA obtenidos, pudiendo distinguir entre el DNA genómico, que aparece como una banda de elevado peso molecular, y el cfDNA, que aparece como bandas del tamaño aproximado de múltiplos de nucleosomas, esto es, en el rango de 100-200 pb.

Tras la extracción se recomienda cuantificar y analizar la calidad del cfDNA. Para la cuantificación se pueden emplear métodos espectrofotométricos, fluorimétricos o de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa, siendo el más habitual y recomendable el método fluorimétrico. Es importante asegurarse de la muestra se encuentra libre de DNA genómico usando técnicas de electroforesis capilar o en microfluído, que permiten ver la distribución de tamaños de los fragmentos de DNA obtenidos, pudiendo distinguir entre el DNA genómico, que aparece como una banda de elevado peso molecular, y el cfDNA, que aparece como bandas del tamaño aproximado de múltiplos de nucleosomas, esto es, en el rango de 100-200 pb (**Figura 14**).

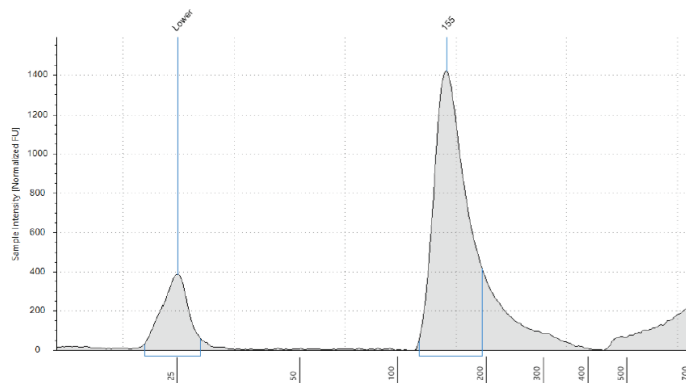


Figura 14. Análisis del tamaño de los fragmentos de DNA mediante el uso de TapeStation.

El DNA circulante liberado en el torrente sanguíneo proviene de células malignas y no malignas que experimentan apoptosis, necrosis o mediante secreción activa.

5.3 ctDNA en linfomas

Aunque algunos subtipos de linfoma, como el linfoma folicular, el linfoma de células del manto y los linfomas T cutáneos, puede tener expresión en sangre periférica, algunos de los subtipos de linfoma más comunes, incluidos el LDCGB y el LH, no suelen presentarla. Por lo tanto, el ctDNA es una opción atractiva para la caracterización molecular en linfomas.

5.3.1 Métodos para la detección de ctDNA en linfoma

Existen diferentes estrategias para la detección de ctDNA que pueden agruparse en dos metodologías: basadas en PCR o en NGS (**Tabla 9** y **Figura 15**).

Los métodos basados en PCR tienen un costo relativamente bajo y cuentan con un límite de detección de 10^{-5} , pero tienen la desventaja de detectar un número limitado de mutaciones, por lo que son especialmente útiles en enfermedades con mutaciones recurrentes de tipo “*hot spot*”. Dado que las neoplasias linfoides presentan gran heterogeneidad, existen pocas alteraciones recurrentes con la frecuencia suficiente para poder utilizar esta metodología, por ejemplo, la detección de mutaciones de *MYD88*^{L265P} en el PCNSL y el linfoma

linfoplasmacítico, *EZH2*^{Y641N} en el LF y LDCGB, o de *XPO1*^{E571K} en el LPM y LH^{158,159}. Alternativamente, existe la posibilidad de diseñar una PCR específica para detectar el reordenamiento clonal del gen de la cadena pesada la inmunoglobulina (IGH) para prácticamente todos los pacientes, aunque para ello se requiere la muestra tumoral inicial para la correcta evaluación del punto de ruptura. Además, también pueden detectarse reordenamientos cromosómicos, como la t(14;18) en el LF y la t(11;14) en linfoma de células del manto^{158,160}.

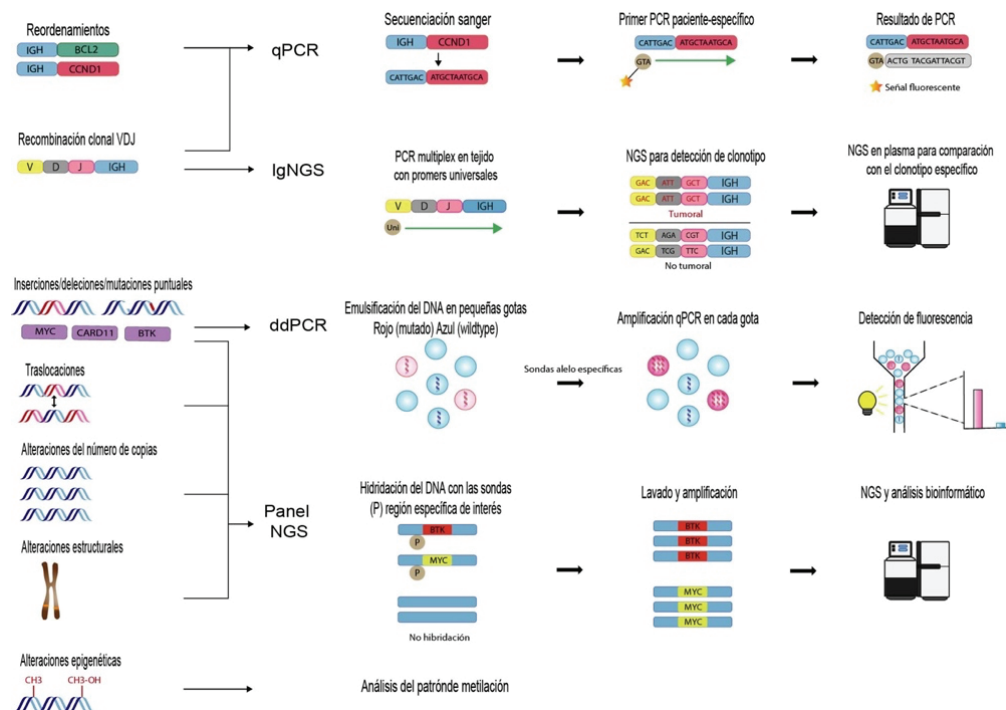


Figura 15. Técnicas para el análisis de ctDNA.

Imagen modificada de Lakhota R, et al ¹⁶⁰

Los métodos basados en NGS son los que actualmente se prefieren para detectar y analizar el ctDNA ya que permiten detectar varios reordenamientos, incluidos los reordenamientos de los genes de las inmunoglobulinas y del receptor de células T, múltiples mutaciones y las alteraciones en el número de copias, además de permitir la identificación de nuevas mutaciones que ocurren durante evolución clonal de la enfermedad, con una sensibilidad comparable a la de los enfoques de PCR de 10^{-5} ¹⁶¹.

La metodología Ig-HTS (*Immunoglobulin high-throughput sequencing*) permite la identificación y seguimiento de cada clonotipo tumoral detectado en el tejido tumoral utilizando cebadores universales dirigidos a genes de inmunoglobulinas (VDJ, DJH e IG-Kappa)^{160,162} proporcionando así información sobre el repertorio de inmunoglobulinas y el seguimiento de cada subclón tumoral lo que espacialmente útil para el seguimiento de la enfermedad mínima residual. En comparación con los métodos basados en PCR, no se necesitan cebadores específicos a cada paciente y las hipermutaciones somáticas del gen IGHV no interfieren con los resultados. Se han reportado la identificación y el seguimiento exitosos del clonotipo en pacientes con LDCBG, LF y linfoma de células del manto (LCM)^{162–164}.

Tabla 9. Métodos para la detección de ctDNA en linfomas (adaptada de Kurtz D¹⁷⁰)

Método	Sensibilidad	Alteraciones	MRD	Ventajas
dPCR	1:10 000	SNVs, traslocaciones	Si, si la mutación “ <i>hot spot</i> ” está presente	Bajo coste, fácil acceso.
Ig-HTS (ClonoSEQ)	1:10 000	VDJ	Sí	Comercialmente disponible
CAPP-Seq	2.5:100 000	SNVs, CNA, traslocaciones, VDJ	Sí	Mayor sensibilidad, estudio de múltiples alteraciones en una sola muestra
Low-pass WGS	1:100	CNA	No	Información de CNA

La tecnología “*Cancer Personalized Profiling by deep sequencing*” (CAPP-seq) es una herramienta sensible que permite secuenciar regiones genómicas de interés (selección específica de regiones de exones e intrones elegidas para cubrir mutaciones recurrentes) detectando simultáneamente diferentes tipos de mutaciones, incluidas las variantes de un solo nucleótido, las inserciones/deleciones, alteraciones en el número de copias y reordenamientos. Esta metodología ha sido empleada en varios estudios en pacientes con linfoma^{165–168}. Recientemente, el grupo de Stanford desarrolló una metodología

mejorada, "PhasE-Seq", que identifica múltiples agrupaciones de mutaciones en una sola molécula de DNA, lo que permite una mayor sensibilidad y maximiza la detección de la enfermedad residual¹⁶⁹.

Otro enfoque para analizar el ctDNA, es una estrategia no dirigida representada por la secuenciación del genoma completo que puede detectar de manera convincente las aberraciones del número de copias somáticas. Este método es menos sensible pero no requiere información previa sobre el genoma del tumor y permite identificar nuevas mutaciones que pueden desarrollarse durante el tratamiento¹⁷¹.

5.3.2 Utilidad del ctDNA para el diagnóstico y el genotipado de los linfomas

El uso del ctDNA no puede reemplazar a la biopsia tisular para el diagnóstico de los linfomas, ya que para ello es necesario evaluar diferentes aspectos histológicos como son la arquitectura y disposición celular; de hecho, se prefieren las biopsias excisionales siempre que sean posibles. Sin embargo, el ctDNA puede desarrollar un papel importante cuando la biopsia tisular no es factible debido a la localización anatómica de la enfermedad o plantean riesgos médicos significativos. Ejemplo de ello es el PCNSL, en el que en ocasiones la citomorfología y la citometría de flujo del LCR no son lo suficientemente sensibles para detectar la enfermedad¹⁶⁰. El perfil mutacional del PCNSL incluye mutaciones somáticas recurrentes de *MYD88*, *CD79B*, *PIM1* y *CARD11* que pueden ser detectables en el LCR mediante el uso del ctDNA. Hiemcke-Jiwa y colaboradores¹⁷² identificaron mediante ddPCR la mutación de *MYD88*^{L265P} en 8 de 11 (73%) muestras de LCR de pacientes con PCNSL en el que el resultado de citopatología había sido negativo. El linfoma intravascular es un subtipo raro de LDCGB caracterizado por la presencia células de linfoma dentro de la luz de los vasos sanguíneos y ninguna masa evidente para biopsiar, con sólo 5-9% de casos con afectación de sangre periférica detectable por citometría de flujo, retrasando el diagnóstico y el tratamiento de los pacientes. Suehara et al¹⁷³ detectaron al menos una mutación de las detectadas en las biopsias tisulares en el plasma de 9 pacientes (100%) mediante la utilización de un panel de 8 genes.

Existen diversos estudios que han demostrado la capacidad para determinar el perfil mutacional de diferentes subtipos histológicos de linfoma utilizando ctDNA. Esto ha resultado particularmente útil en el LH, ya que debido al bajo contenido de células tumorales (en torno al 1%), es necesario recurrir a métodos como la microdissección láser o la selección celular por citometría para poder realizar el genotipado en las muestras tisulares. Dos estudios recientes determinaron el perfil mutacional mediante la utilización de técnicas de NGS en pacientes con LH, detectando al menos una mutación en el 70-81% de los casos y con una elevada concordancia con las muestras tisulares en los casos con muestra disponibles, siendo los genes más frecuentemente mutados *STAT6*, *TNFAIP3*, *SOCS1*, *B2M*, *ITPKB* y *GNA13*. Además, encontraron que aquellos pacientes que al diagnóstico presentaban un estadio avanzado de la enfermedad, IPI de alto riesgo y VMT tenían niveles elevados de ctDNA^{174,175}.

Sarkozy y colaboradores¹⁷⁶ evaluaron la heterogeneidad clonal en la biopsia tisular y el plasma al diagnóstico en 34 pacientes con LF incluidos en el estudio PRIMA (NCT00140582), detectando al menos un clonotipo (2 a 20 subclones/caso) en el 74% de las muestras de plasma, comparado con el 85% de las muestras tisulares (2 a 71 subclones/caso). En más de la mitad de los casos, la distribución de subclones difería entre las muestras de tumor y de plasma, lo que refleja una alta heterogeneidad clonal y diversidad en la diseminación de subclones (**Figura 16**). En el momento de la progresión clínica siempre debe intentarse obtener una nueva biopsia para descartar la transformación histológica (HT) a un linfoma agresivo, generalmente LDCGB, aunque no siempre es factible para cada episodio de la enfermedad, e incluso cuando se realiza, la biopsia puede no corresponder al sitio de la HT. Scherer et al¹⁶⁶ compararon muestras emparejadas de tumor y plasma en un pequeño número de pacientes con LF transformado, detectando nuevas mutaciones que no se identificaron al diagnóstico en el ctDNA coincidente de la muestra al momento de la transformación, pudiendo predecir la transformación con una sensibilidad del 83% y un valor predictivo positivo del 91%, además de detectar mutaciones específicas en el plasma de algunos pacientes semanas o meses antes del diagnóstico clínico de la HT.

Múltiples estudios han demostrado una sólida concordancia entre las alteraciones genéticas identificadas a partir de la secuenciación de muestras pareadas de tumor y plasma en pacientes con LDCGB. Rossi y colaboradores¹⁷⁷, demostraron una sensibilidad >90% y una especificidad cercana al 100% para detectar mutaciones con una frecuencia alélica >20% en el plasma de pacientes con LDCGB, detectando también mutaciones no presentes en la biopsia tisular, probablemente debido a la heterogeneidad espacial del tumor. De manera similar, otro estudio con 86 pacientes reveló una concordancia del 78% para la detección de reordenamientos de *MYC*, *BCL2* y *BCL6*, confirmados por FISH¹⁷⁸. El uso del ctDNA no se ha limitado exclusivamente a los linfomas de células B. Miljkovic et al¹⁷⁹ utilizaron la monitorización mediante NGS del receptor de células T (TCR) en 45 pacientes con linfoma de células T periférico previo al inicio del tratamiento de primera línea, detectando al menos un clonotipo TCR β y/o TCR γ específico en el 67% de pacientes con muestra de suero basal.

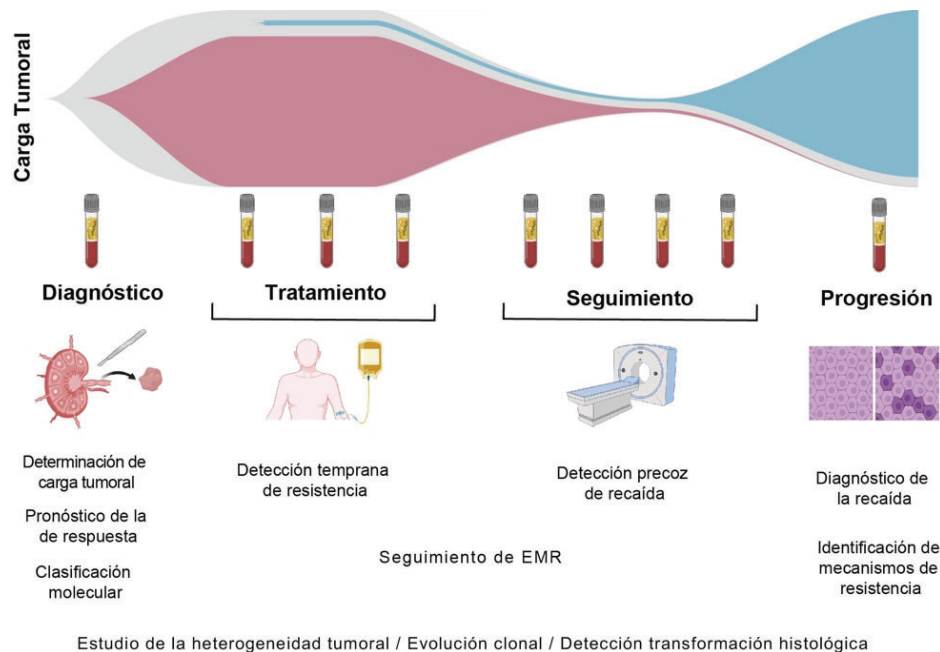


Figura 16. Principales aplicaciones del ctDNA en linfoma.

La detección de ctDNA en diferentes momentos de la enfermedad puede ayudar a mejorar el diagnóstico y la evaluación pronóstica, evaluar la respuesta terapéutica permitiendo la detección temprana de clones resistentes al tratamiento o la recidiva de la enfermedad.

5.3.3 Valor pronóstico del ctDNA

Además de la cuantificación global de ctDNA, la NGS permite la identificación del perfil mutacional. El grupo de Stanford utilizó los perfiles de mutaciones somáticas para desarrollar una herramienta para la clasificación de células de origen a partir de muestras de plasma, observando una tasa de concordancia del 80% con la clasificación por el algoritmo de Hans. Los pacientes identificados como GCB tuvieron una SLP superior a los identificados como no GCB, en consonancia con los resultados de supervivencia descritos previamente entre los subtipos de COO¹⁶⁶. En el LF, el m7-FLIPI¹⁸⁰ incorpora el estado mutacional de 7 genes en al modelo pronóstico clinicobiológico y dado que el ctDNA refleja mucho mejor la heterogeneidad del tumor, el cálculo de este índice a partir del ctDNA podría permitir un pronóstico más preciso¹⁵⁸.

Varios estudios han reportado la asociación de los niveles basales de ctDNA con carga tumoral y su papel pronóstico en pacientes con linfoma. En el LH y el LDCGB, niveles elevados de ctDNA se han correlacionaron con variables clínicas asociadas con la carga tumoral como lo son el estadio Ann Arbor avanzado, niveles séricos elevados de lactato deshidrogenasa, un mayor puntaje del índice pronóstico internacional, y el VMT^{162,167,175,181}. Además, los niveles de ctDNA también han correlacionado con la SLP, SLE y SG en pacientes que recibieron tratamiento de primera línea o de rescate (**Tabla 10**).

Combinando varios parámetros como el IPI, el VMT y el COO al ctDNA, Kurtz y colaboradores¹⁸² desarrollaron un sofisticado modelo personalizado de predicción de la respuesta llamado CIRI (*Continuous Individualized Risk Index*) en pacientes con LDCGB. CIRI se basa en un modelo de “probabilidad de ganar”, en el que una predicción inicial basada en marcadores pronósticos previos al tratamiento se actualiza a medida que se dispone de datos adicionales durante el tratamiento para cada paciente. En comparación con cada parámetro de forma individual, CIRI demostró una capacidad superior para predecir los resultados de la SLE a los 24 meses^{160,182} (**Figura 17**).

También se ha explorado la utilidad del ctDNA en los linfomas indolentes. En el LF, los niveles de ctDNA previos al tratamiento se correlacionan con el VMT ($R=0.6$, $P<0.0001$) y aquellos pacientes con niveles bajos de ctDNA (<2550

Eqg/mL de plasma) mostraron una mayor SLP a cuatro años en comparación con aquellos con niveles elevados (96% vs 73%, IC95%: 87% a 100%, $P=0.04$)¹⁸³.

En relación con la aparición de nuevas terapias, el ctDNA ha demostrado su utilidad pronóstica en la respuesta al tratamiento de pacientes con LDCGB tratados con células CAR-T. Utilizando lpWGS para analizar las alteraciones del número de copias en muestras de plasma, Cherng¹⁸⁴ y colaboradores demostraron que aquellos pacientes con una mayor inestabilidad genómica presentaron una menor tasa de RC a los 3 meses (28% vs 56%, $P=0.0029$) y una peor SLP ($P=0.0007$; HR 2.11) y SG ($P=0.0026$; HR 2.10), siendo la delección de 10q23.3 la alteración que se asoció más frecuentemente a un pronóstico adverso.

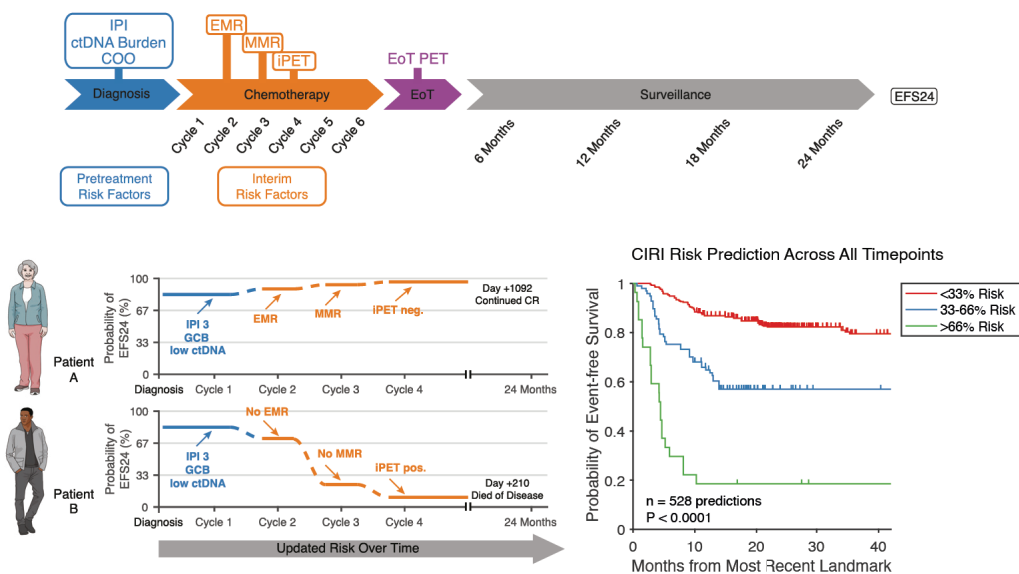


Figura 17. Modelo CIRI (Continuous Individualized Risk Index) para pacientes con LDCGB.

Tanto el paciente A (arriba) como el paciente B (abajo) tienen los mismos factores de riesgo antes del tratamiento., sin embargo, la probabilidad de alcanzar una SLE a los 24 meses se va actualizando a manera que se van obteniendo información proveniente de la evaluación de la respuesta mediante el ctDNA y el PET/CT. En el gráfico, se observa la SLE acorde a la estratificación por el modelo CIRI en una serie de 132 pacientes con LDCGB. (Modificado de Kurtz, et al¹⁸²)

5.3.4 Utilidad del ctDNA para la monitorización de la respuesta durante el tratamiento y el seguimiento de la enfermedad.

La cinética en la depuración del ctDNA durante el tratamiento también ha demostrado tener impacto en el pronóstico de los pacientes con linfoma. En el LDCGB, Kurtz y colaboradores demostraron que aquellos pacientes en los que el ctDNA disminuía en 2 logaritmos de los niveles basales de ctDNA tras el primer ciclo de tratamiento (respuesta molecular temprana o EMR) y de 2.5 logaritmos tras el segundo ciclo (respuesta molecular mayor o MMR) se asociaron con una mejor SLE (EMR HR: 6.5, IC95%: 2-21; MMR HR 26, IC95%: 6-111) y SG (EMR HR 16, IC95%: 3.6-70; MMR HR: 11, IC95%: 2.1-58). La EMR también fue pronóstica para la SLE y SG en pacientes que habían recibido tratamiento de rescate¹⁶⁷. Resultados similares se han reportado en pacientes con estadios avanzados de LH, donde la disminución en 2 logaritmos tras dos ciclos de tratamiento con AVBD se asoció a una mejor SLP¹⁷⁵. Otro estudio con 121 pacientes con LH determinó la reducción de ctDNA tan pronto como 1 semana después del inicio del tratamiento de primera línea¹⁸⁵.

En el LCM, aquellos pacientes en los que dejaba de detectarse ctDNA tras 2 ciclos de inducción con bortezomib y DA-EPOCH-R tuvieron una mayor SLP (2.7 vs. 1.8 años, $P= 0.005$) y SG (13.8 vs. 7.4, $P= 0.03$) en comparación con aquellos con ctDNA detectable¹⁶³.

El seguimiento de los pacientes tras haber completado el tratamiento se basa en exploración física y controles analíticos realizados a intervalos regulares, sin contar hoy en día con alguna estrategia que permita detectar la recaída de la enfermedad asintomática, siendo la mayoría detectadas después del inicio de los síntomas¹⁶⁰. Aunque los estudios sobre la detección temprana de la recaída mediante TAC o PET/TAC arrojan resultados contradictorios, la mayoría de ellos no han demostrado eficacia en pacientes que han alcanzado una respuesta completa.^{162,186,187}

En este contexto, el ctDNA ha demostrado ser una estrategia mínimamente invasiva y fácil de monitorizar para detectar recaídas asintomáticas, especialmente en pacientes de alto riesgo. En un estudio llevado a cabo por Roschewski et al.¹⁶², se realizó un seguimiento de 107 pacientes con LDCGB

que habían alcanzado la RC después de la primera línea de tratamiento, utilizando muestras de suero secuenciadas mediante NGS de la región VDJ del gen de las inmunoglobulinas, así como TAC, durante un periodo de hasta 5 años después de la finalización del tratamiento. Se detectaron niveles de ctDNA en 15 de los 17 pacientes (88%) que recayeron, con una mediana de 3.5 meses (rango 0-200) antes de la evidencia clínica o por imagen de enfermedad, con un HR para la progresión de 228 (IC95%: 51-1022). De esta forma, la detección precoz permite avanzar el inicio del tratamiento de rescate, ya que estudios recientes han asociado una mejor respuesta a la quimioterapia o al tratamiento con células CAR-T⁴⁰.

El análisis longitudinal de las muestras de plasma recolectadas durante el tratamiento ha permitido la identificación de nuevas mutaciones y la detección de los clones resistentes que se han seleccionado durante la evolución clonal de la enfermedad^{160,166,188}. Agarwal y colaboradores¹⁸⁹ analizaron muestras secuenciales de plasma de pacientes con LCM tratados con ibrutinib y venetoclax identificando perfiles genómicos que claramente diferenciaban a los pacientes que respondieron al tratamiento de los que no. Las mutaciones de *ATM* estuvieron presentes en la mayoría de los pacientes que lograron una respuesta completa, mientras que la pérdida de la región 9p21.1–p24.3 y/o mutaciones en los componentes del complejo remodelador de la cromatina SWI–SNF estuvieron presentes en todos los pacientes con resistencia primaria y en la mayoría de los pacientes en recaída. El mismo grupo también analizó muestras de plasma de pacientes con LLC demostrando que el ctDNA no es sólo un reflejo del perfil mutacional de las células malignas circulantes, sino que además permite evaluar los cambios en los diferentes compartimentos de la enfermedad tras el tratamiento con ibrutinib o venetoclax, permitiendo monitorear la evolución clonal a lo largo del tiempo e identificando la aparición de cambios genómicos asociados con el síndrome de Richter¹⁹⁰.

Otro estudio demostró la aparición de la mutación *BTK*^{C481S} en muestras seriadas de plasma de un paciente con LDCGB que recibió ibrutinib en monoterapia¹⁹¹. Más recientemente, Sworder et al¹⁹² observaron la aparición de mutaciones en *CD19*, *PAX5* y *TP53* al momento de la recaída de pacientes con LDCGB tratados

con terapia con células CAR-T, lo que representa un posible mecanismo de resistencia a este nuevo enfoque terapéutico. Finalmente, Spina et al.¹⁷⁵ exploraron los patrones de evolución mutacional en muestras seriadas de ctDNA en 13 pacientes con LH en recaída tras la terapia de primera línea con ABVD (doxorubicina, bleomicina, vinblastina y dacarbazina) o tratamiento de rescate. Si bien encontraron que las mutaciones ancestrales en su mayoría persisten con el tiempo, todos los casos demostraron cambios clonales con nuevas mutaciones detectadas en la muestra de plasma a la recaída.

Tabla 10. Principales estudios de ctDNA en linfomas (adaptada de Lakhotia R, et al ¹⁶⁰)

	Autor	Metodología	Resultados
LH	Spina ¹⁷⁵ N=112	CAPP-Seq	Los pacientes con disminución en 2 log del ctDNA tras 2 ciclos de ABVD alcanzaron la RC y tuvieron una mejor SLP. El ctDNA es mejor predictor de la respuesta que el PET interim
	Sobesky ¹⁸⁵ N=121	Panel NGS	No se observó correlación entre los niveles basales de ctDNA y la respuesta al tratamiento. Niveles indetectables de ctDNA tras 2 ciclos de tratamiento se asociaron a la RC y mejor SLP
LF	Sarkozy ¹⁷⁶ N=34	IgNGS	Pacientes con niveles elevados de ctDNA tuvieron una peor SLP (15.3 meses vs. no alcanzada, $P= 0.004$). En el subgrupo de pacientes que recibió mantenimiento con rituximab esta diferencia no se mantuvo ($P= 0.18$)
	Delfau-Larue ¹⁸³ N=133	ddPCR	Los niveles basales elevados de ctDNA se asociaron con una peor SLP a 4 años (73% frente a 96%, $P= 0.04$). Niveles elevados de ctDNA correlacionaron con un mayor VMT ($>510 \text{ cm}^3$) ($P= 0.0006$).
LCM	Lakhotia ¹⁶³ N=53	IgNGS	Los pacientes con niveles indetectables de ctDNA tras de 2 ciclos de inducción tuvieron una mejor SLP (2.7 vs. 1.8 años, $P= 0.005$) y SG (13.8 años vs. 7.4 años, $P= 0.03$) en comparación con aquellos en los que se seguía detectando
	Smith ¹⁹³ N=373	IgNGS	La mediana de SLP para pacientes con ctDNA indetectable después de 3 ciclos de R-bendamustina fue de 58.9 meses, en comparación con 26.9 meses en pacientes con persistencia de detección de ctDNA ($P= 0.002$).

LDCGB	Roschewski ¹⁶² N=198	IgNGS	Los niveles de ctDNA previos al tratamiento se correlacionan con el IPI, el VMT, los niveles de LDH y el estadio Ann Arbor ($P < 0.0001$). Los pacientes con ctDNA detectable tras dos ciclos de DA-EPOCH-R tuvieron un tiempo a la progresión y una SG a 5 años inferiores (41.7% vs. 80.2%, $P < 0.0001$)
	Kurtz ¹⁶⁷ N=217	CAPP-Seq	Los niveles de ctDNA previos al tratamiento se correlacionan con el IPI, niveles de LDH y el estadio Ann Arbor ($P < 0.0001$). La EMR y MMR fueron pronósticas para la SLP y SG tras el tratamiento de primera línea (EMR, $P=0.0015$ y $P < 0.001$; MMR, $P < 0.001$ y $P=0.0047$ respectivamente). La EMR fue pronóstica para la SLP y la SG tras la terapia de rescate ($P=0.011$ y $P=0.011$ respectivamente)
	Bohers ¹⁹⁴ N=30	Panel NGS	Los niveles de ctDNA previos al tratamiento se correlacionan con el IPI ($P=0.02$), LDH ($P=0.001$) y VMT ($P < 0.001$)
	Alig ¹⁸¹ N=267	CAPP-Seq	Niveles elevados de ctDNA (>2.5 hGE/mL) se asociaron con un tiempo al inicio del tratamiento inferior, así como a las variables relacionadas con la carga tumoral: LDH, IPI, VMT ($P < 0.001$). También se asociaron a una SLE menor (HR 1.5, IC95% 1.2-2.0)
	Frank ¹⁹⁵ N=69	IgNGS	Pacientes con ctDNA indetectable en el día +28 tras la infusión de células CAR-T tuvieron una mejor SLP (no alcanzada vs 7.4 meses, $P=0.0005$). En los pacientes con PET positivo el día +28, aquellos con ctDNA negativo (N= 10) tuvieron una mediana de SLP mejor que los pacientes con ctDNA positivo (N= 13) (no alcanzada frente a 3.1 meses, $P=0.0033$)
	Meriranta ¹⁹⁶ N=97	NGS panel	Niveles basales elevados de ctDNA (>3.75 hGE/mL) se asociaron con una peor tasa de RC y SLP (HR 3.32, IC95%: 1.41-7.83, $P=0.006$). Pacientes con niveles detectables de ctDNA al finalizar el tratamiento tuvieron una peor SLP ($P < 0.001$) y SG ($P=0.004$) en comparación con aquellos casos con ctDNA indetectable

II. HIPÓTESIS

HIPÓTESIS

Las hipótesis de trabajo en los diferentes proyectos que convergen en la presente tesis doctoral se pueden sistematizar del siguiente modo:

El linfoma difuso de células grandes B, el linfoma de células B primario de mediastino y el linfoma de células grandes B testicular se caracterizan por presentar mutaciones somáticas y alteraciones en el número de copias que pueden asociarse a la evolución de la neoplasia y en especial a las respuestas a tratamientos específicos como son las nuevas moléculas con efecto diana que constituyen el avance más innovador en el tratamiento de los linfomas.

Un problema crítico en muchas ocasiones es la dificultad para conseguir muestras tisulares suficientes para el diagnóstico y el estudio molecular. Las técnicas de biopsia líquida pueden solventar este problema, puesto que se utiliza la sangre periférica como fuente de DNA para el estudio de mutaciones y otras alteraciones genéticas. Hay evidencias de que las técnicas de *Next Generation Sequencing* son muy sensibles para detectar presencia de enfermedad y permitir su caracterización molecular utilizando como fuente el DNA circulante tumoral. De este modo, podrían ser una fuente adicional para el estudio de las alteraciones genéticas en los linfomas de células grandes.

Por otro lado, también se ha observado que los pacientes con neoplasias activas presentan niveles más elevados de ctDNA, y que aquellos pacientes con concentraciones más elevadas en sangre periférica tienen una peor tasa de respuesta y un peor pronóstico de la enfermedad. En este mismo sentido, los niveles de ctDNA podrían utilizarse como una medida indirecta para estimar la carga tumoral de la enfermedad y correlacionarse con otras variables asociadas. El linfoma testicular es una variante con un perfil mutacional y de alteraciones del número de copias particular que difiere del LDCGB ABC ganglionar y que podría ser muy similar a otros linfomas con afectación de sitios inmunoprivilegiados como lo es el linfoma difuso de células de células grande B primario del sistema nervioso central, lo que podría ser esencial para comprender la patogénesis de la enfermedad. Además, algunas de las variables moleculares predecirían el resultado clínico y serían marcadores más fiables en cuanto al pronóstico de los pacientes.

III. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Analizar el perfil mutacional al diagnóstico en el linfoma difuso de células grandes (LDCGB) y de dos variantes con personalidad propia, el linfoma de células B primario de mediastino y el linfoma de células grandes B testicular (TLBCL), con el objetivo de integrar las anomalías en el número de copias, mutaciones genéticas y reordenamientos, y analizar el impacto clínico, incluida la respuesta al tratamiento y la supervivencia general en la era de la inmunoterapia.

Por otro lado, caracterizar el perfil genómico en estos linfomas mediante técnicas de detección a partir de DNA circulante tumoral (ctDNA) en plasma de sangre periférica y compararlo con la información obtenida en la biopsia tisular.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Implementar el uso del ctDNA como fuente para determinar el perfil mutacional del LDCGB y comparar los estudios mutacionales de ctDNA con los resultados obtenidos a partir de la biopsia tisular.
2. Correlacionar los niveles de ctDNA con las variables clínicas iniciales, la respuesta terapéutica y la supervivencia de los pacientes.
3. Correlacionar el valor del volumen metabólico tumoral con las variables clínicas iniciales, los niveles de ctDNA, la respuesta terapéutica y la supervivencia de los pacientes.
4. Implementar el uso del ctDNA como fuente para el estudio genético del LPM, incluido el perfil mutacional y las alteraciones en el número de copias, y compararlo con los resultados obtenidos a partir de la biopsia ganglionar.
5. Correlacionar los niveles de ctDNA con las variables clínicas iniciales, la respuesta terapéutica y la supervivencia de los pacientes.
6. Evaluar las mutaciones genéticas, las alteraciones del número de copias, las translocaciones, así como la determinación de la célula de origen en TLBCL, proporcionando un panorama completo de las alteraciones genómicas recurrentes que definen el curso clínico de esta enfermedad.

7. Correlacionar las anomalías genéticas con las principales características clínico-biológicas del linfoma, respuesta y supervivencia de los pacientes.
8. Comparar las alteraciones genéticas recurrentes en el TLBCL con dos cohortes de pacientes: una de pacientes con LDCGB nodal y otra de pacientes de con linfoma difuso de células de células grande B primario del sistema nervioso central.

IV. MATERIAL, MÉTODOS, Y RESULTADOS

PRIMER TRABAJO

Mutational Landscape and Tumor Burden Assessed by Cell-Free DNA in Diffuse Large B-Cell Lymphoma: a Population-based Study

Alfredo Rivas-Delgado, Ferran Nadeu, Anna Enjuanes, Sebastián Casanueva-Eliceiry, Pablo Mozas, Laura Magnano, Natalia Castrejón de Anta, Jordina Rovira, Ivan Dlouhy, Silvia Martín, Miguel Osuna, Sonia Rodríguez, Magda Pinyol, Tycho Baumann, Silvia Beà, Olga Balagué, Julio Delgado, Neus Villamor, Xavier Setoain, Elías Campo, Eva Giné, Armando López-Guillermo,

Clin Cancer Res. 2021;27(2):513-521.

Factor de Impacto JCR 2021: 13.801 (Q1)

RESUMEN DEL PRIMER TRABAJO

El LDCGB es una neoplasia con gran heterogeneidad clínico-biológica y cuyo perfil mutacional ha demostrado ser importante en la evolución de los pacientes. El ctDNA representa una fuente accesible y a tiempo real para la identificación de mutaciones. El objetivo de este estudio fue analizar el perfil mutacional de pacientes con LDCGB en el momento del diagnóstico y correlacionar los niveles de ctDNA con las variables clínicas iniciales, la respuesta terapéutica y la supervivencia de los pacientes.

En el presente trabajo se incluyeron 100 pacientes con LDCGB de forma prospectiva entre 2016 y 2019. Se obtuvo una muestra de plasma al diagnóstico y previo al inicio del tratamiento. Se pudo realizar la determinación del perfil mutacional en 79 pacientes (H/M 42/37; edad mediana 63 años) detectando al menos una mutación en 69 de los casos (87.3%). Los genes mutados con mayor frecuencia fueron *KMT2D*, *TP53*, *TNFRSF14*, *MYD88*, *BCL2*, *SOCS1*, *CREBBP*, *MYC* y *EP300*. Además, a partir del perfil mutacional del ctDNA se pudo clasificar a los pacientes de acuerdo con los grupos genómicos descritos recientemente utilizando la herramienta LymphGen. La sensibilidad del ctDNA para detectar mutaciones en las muestras de FFPE basales fue del 69% (IC95%: 64,1-73,9). Todos los pacientes recibieron tratamiento con inmunoterapia, tras el cual 59 (75%) alcanzaron RC y 4 (5%) RP, mientras que 16 (20%) fueron refractarios, incluidas 7 muertes tempranas. Cuatro de los 59 pacientes con RC (7%) finalmente recayeron en una mediana de 14 meses (rango de 10 a 19 meses). Los niveles más elevados de ctDNA (definido como $>2.5 \log \text{ hGE/mL}$) se correlacionaron significativamente con la presencia de síntomas B, niveles séricos elevados de LDH, $\beta 2$ -microglobulina, estadio IV de Ann Arbor y con IPI de riesgo intermedio-alto o alto ($P < 0.05$ en todos los casos). En el grupo de pacientes tratados con intención curativa, aquellos con niveles elevados de ctDNA pretratamiento tuvieron una tasa de RC, SLP y SG significativamente más bajas que aquellos con niveles bajos (tasa de RC, 65% frente a 96%, $P < 0.004$; SLP a los 24 meses de 73 vs. 100%, $P = 0.016$; y SG a 24 meses de 100 vs. 73%, $p = 0.001$). Además, se evaluó el VMT y la GTL en 56 pacientes de nuestra serie. La mediana de VMT pre-tratamiento fue de 231 cm³ (rango, 0 a 4,171

cm³), mientras que la mediana de GTL fue de 1836 (rango, 0 a 24,367). Como era de esperar, el VMT y la GTL elevados se correlacionaron con la enfermedad voluminosa, la presencia de síntomas B, niveles séricos elevados de LDH, β 2-microglobulina, estadio avanzado e IPI de alto riesgo ($P < 0.05$ en todos los casos), además de presentar una menor tasa de respuesta al tratamiento (VMT, 97% frente a 41%, $p < 0.001$; GTL, 93% frente a 39%, $P < 0.001$). Además, la concentración de ctDNA se correlacionó significativamente con el VMT ($R = 0.57$, $P < 0.001$) y GTL ($R = 0.45$; $P < 0.001$), confirmando que las mediciones de ctDNA están relacionadas con la carga tumoral del linfoma. En conclusión, el ctDNA es una fuente alternativa para estimar la carga tumoral y determinar el perfil mutacional y la clasificación genética del tumor, con implicaciones pronósticas y pueden contribuir a un futuro tratamiento personalizado.



Mutational Landscape and Tumor Burden Assessed by Cell-free DNA in Diffuse Large B-Cell Lymphoma in a Population-Based Study

Alfredo Rivas-Delgado^{1,2,3}, Ferran Nadeu^{2,4}, Anna Enjuanes^{2,4}, Sebastián Casanueva-Eliceiry⁵, Pablo Mozas^{1,2}, Laura Magnano^{1,2}, Natalia Castrejón de Anta⁶, Jordina Rovira¹, Ivan Dlouhy¹, Silvia Martín^{2,3}, Miguel Osuna⁶, Sonia Rodríguez⁷, Marc Simó⁸, Magda Pinyol^{2,4}, Tycho Baumann^{1,2,4}, Silvia Beà^{2,3,4}, Olga Balagué^{2,3,4,6}, Julio Delgado^{1,2,3,4}, Neus Villamor^{2,4,6}, Xavier Setoain^{2,5,9}, Elías Campo^{2,3,4,6}, Eva Giné^{1,2,4}, and Armando López-Guillermo^{1,2,3,4}

ABSTRACT

Purpose: We analyzed the utility of cell-free DNA (cfDNA) in a prospective population-based cohort to determine the mutational profile, assess tumor burden, and estimate its impact in response rate and outcome in patients with diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL).

Experimental Design: A total of 100 patients were diagnosed with DLBCL during the study period. Mutational status of 112 genes was studied in cfDNA by targeted next-generation sequencing. Paired formalin-fixed, paraffin-embedded samples and volumetric PET/CT were assessed when available.

Results: Appropriate cfDNA to perform the analyses was obtained in 79 of 100 cases. At least one mutation could be detected in 69 of 79 cases (87%). The sensitivity of cfDNA to detect the mutations was 68% (95% confidence interval, 56.2–78.7). The mutational landscape found in cfDNA samples was highly consistent with that shown in the tissue and allowed genetic classification

in 43% of the cases. A higher amount of circulating tumor DNA (ctDNA) significantly correlated with clinical parameters related to tumor burden (elevated lactate dehydrogenase and β 2-microglobulin serum levels, advanced stage, and high-risk International Prognostic Index) and total metabolic tumor volume assessed by PET/CT. In patients treated with curative intent, high ctDNA levels (>2.5 log hGE/mL) were associated with lower complete response (65% vs. 96%; $P < 0.004$), shorter progression-free survival (65% vs. 85%; $P = 0.038$), and overall survival (73% vs. 100%; $P = 0.007$) at 2 years, although it did not maintain prognostic value in multivariate analyses.

Conclusions: In a population-based prospective DLBCL series, cfDNA resulted as an alternative source to estimate tumor burden and to determine the tumor mutational profile and genetic classification, which have prognostic implications and may contribute to a future tailored treatment.

Introduction

Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) is a heterogeneous entity from a biological and clinical standpoint. Two main molecular

subtypes are recognized according to their cell-of-origin (COO): the germinal center and activated B-cell subtypes, with up to 15%–18% of cases being unclassifiable (1, 2). More recently, new genetic subtypes have been identified beyond COO, incorporating mutations, copy-number alterations (CNA), and structural variants, aimed at grouping patients based on common mechanisms of lymphomagenesis (3–5).

Genetic studies are usually performed in tumor tissue. However, in recent years, the interest for the detection and study of cell-free DNA (cfDNA) has provided a noninvasive tool for diagnosis, disease monitoring, clinical decision-making, and treatment selection in oncology (6). In the field of lymphoid neoplasms, some studies have highlighted the potential of cfDNA in determining the mutational profile of DLBCL, as well as the COO molecular subtype (7, 8), whereas others have focused on the prognostic utility of the amount of circulating tumor DNA (ctDNA), as a surrogate of tumor burden, compared with CT or PET imaging (9–11). Moreover, Kurtz and colleagues (12) showed that pretreatment ctDNA levels and molecular responses, either at diagnosis or relapse, were independent prognostic markers in DLBCL.

On the other hand, new biomarkers obtained at baseline PET/CT are under investigation, the total metabolic tumor volume (TMTV) and the total lesion glycolysis (TLG; ref. 13). High TMTV has been associated with a worse progression-free survival (PFS) and/or overall survival (OS) in DLBCL and other lymphoma subtypes (13–15).

The aim of this study was to prospectively study in a real-life setting the utility of plasma cfDNA to determine the mutational profile, assess

¹Department of Hematology, Hospital Clínic de Barcelona, Barcelona, Spain.

²Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain.

³Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain.

⁴Centro de Investigación Biomédica en Red de Cáncer (CIBERONC), Barcelona, Spain.

⁵Department of Nuclear Medicine, Hospital Clínic de Barcelona, Barcelona, Spain.

⁶Hematopathology Unit, Department of Pathology, Hospital Clínic de Barcelona, Barcelona, Spain.

⁷Department of Radiology, Hospital Clínic de Barcelona, Barcelona, Spain.

⁸Department of Nuclear Medicine, Instituto Universitario Dexeus, Grupo Quiron Salud, Barcelona, Spain.

⁹Centro de Investigación Biomédica en Red de Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBERBBN), Madrid, Spain.

Note: Supplementary data for this article are available at Clinical Cancer Research Online (<http://clincancerres.aacrjournals.org/>).

A. Rivas-Delgado and F. Nadeu contributed equally as co-first authors of this article.

E. Giné and A. López-Guillermo contributed equally as co-senior authors of this article.

Corresponding Author: Alfredo Rivas-Delgado, Department of Hematology, Hospital Clínic de Barcelona, Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain. Phone: +34932275475; E-mail: arivas@clinic.cat

Clin Cancer Res 2021;27:513–21

doi: 10.1158/1078-0432.CCR-20-2558

©2020 American Association for Cancer Research.

Translational Relevance

Previous studies have highlighted the potential of cell-free DNA (cfDNA) to assess the mutational profile in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL). This population-based prospective study showed that cfDNA is a reliable source for DLBCL genotyping, allowing us to classify the cases into the recently described genetic subtypes, providing evidence to use cfDNA as a source for molecular classification. Also, baseline circulating tumor DNA (ctDNA) levels significantly correlated with clinical and volumetric PET/CT parameters of tumor burden. Moreover, high ctDNA levels (>2.5 log hGE/mL) were associated with lower complete response, shorter progression-free, and overall survival. To our knowledge, this is the first confirmation of this finding in a prospective single-center real-life series.

tumor burden, and estimate its impact on response and outcome of patients with DLBCL.

Materials and Methods

Patients

A total of 100 patients consecutively diagnosed with DLBCL according to the World Health Organization classification (1) were prospectively enrolled from September 2016 to March 2019. High-grade B-cell lymphoma not otherwise specified (NOS) and high-grade B-cell lymphoma with *MYC* and *BCL2* and/or *BCL6* rearrangements were also included, whereas primary mediastinal large B-cell lymphomas, posttransplant lymphoproliferative disorders or other immune-related lymphomas, and cases with a low-grade lymphoma component were excluded. Sufficient cfDNA to assess the mutational profile was obtained from 79 cases, which constituted the subjects of the study. Sample collection and processing are detailed in Supplementary Materials and Methods.

The main clinicobiological and evolutionary characteristics were recorded and analyzed as described previously (16). These variables included: (i) clinical data: age, gender, performance status (PS) according to the Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) scale, presence of B symptoms, and bulky disease (defined as a tumor diameter >7 cm); (ii) hematologic and biochemical parameters: white blood cell and lymphocyte counts, hemoglobin, serum lactate dehydrogenase (LDH), and β_2 -microglobulin levels; (iii) tumor burden data: nodal and extranodal involvement, number of extranodal involved sites, palpable splenomegaly, bone marrow infiltration, and Ann Arbor Stage; and (iv) the International Prognostic Index (IPI).

Staging was performed according to standard procedures, including PET/CT and unilateral bone marrow biopsy (17). All, but two patients, who died before starting therapy, were treated with chemoimmunotherapy, mostly ($N = 62$, 78%) R-CHOP (rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone; Table 1). Responses were assessed by end-of-therapy PET/CT according to standard guidelines (18). The median follow-up for surviving patients was 23.5 months (range, 8.6–42 months). Patients provided written informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki, and the study was approved by the institutional review board.

Histologic review

Histologic diagnosis, including morphology and IHC, was reviewed by O. Balagué, N. Castrejón de Anta, and E. Campo. The percentage of

Table 1. Main baseline features, treatment, and response of the 79 patients with DLBCL.

Characteristics	N (%)
Median age (range)	63 (20–94)
Male/female	42/37 (53/49)
Histology	
DLBCL, NOS	63 (80)
High-grade B-cell lymphoma, NOS	8 (10)
High-grade B-cell lymphoma with <i>MYC</i> and <i>BCL2</i> and/or <i>BCL6</i> rearrangements	8 (10)
COO classification ^a	
Germinal center B-cell	39 (59)
Activated B-cell	19 (29)
Unclassified	8 (12)
ECOG PS ≥ 2	29 (37)
B symptoms	31 (39)
Stage	
I/II	12/17 (15/22)
III/IV	7/43 (9/54)
Bone marrow infiltration ^a	20 (27)
Bulky mass (>7 cm)	21 (27)
LDH $>$ normal	45 (57)
IPI	
Low risk	24 (30)
Low-intermediate risk	17 (21.5)
High-intermediate risk	17 (21.5)
High risk	21 (27)
PET/CT baseline parameters ^b	
Median TMTV (range)	207 (0–4,171)
Median TLG (range)	1,525 (0–26,295)
Treatment	
R-CHOP	62 (78)
Intensive chemoimmunotherapy	7 (9)
R-CVP/R-GEMOX	8 (10)
Died before starting treatment	2 (3)
Response to treatment	
Complete response	59 (75)
Partial response	4 (5)
Progressive disease	16 (20)

Abbreviations: R-CVP, rituximab, cyclophosphamide, vincristine, and prednisone; R-GEMOX, rituximab, gemcitabine, and oxaliplatin.

^aThe number of patients in whom the variable was available: bone marrow infiltration, 73; COO, 66.

^bPET/CT was available in 63 cases.

tumor infiltration and the expression of *MYC*, *BCL2*, *BCL6*, and *p53* were semiquantitatively estimated. *MYC*, *BCL2*, and *BCL6* rearrangements were routinely assessed by FISH using both fusion and break-apart probes. COO assessment was performed by means of Lymph2Cx Assay (NanoString Technologies; Supplementary Materials and Methods).

Mutational profile

The mutational status of 112 recurrently mutated genes in B-cell lymphoma was examined by targeted next-generation sequencing (NGS; Supplementary Table S1). Libraries were performed with 15–30 ng of cfDNA and 150 ng of genomic DNA (gDNA) obtained from plasma and formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) biopsy, respectively, using molecular-barcoded library adapters (ThruPLEX Tag-seq Kit, Takara) coupled with a custom hybridization capture-based method (SureSelect XT Target Enrichment System Capture strategy, Agilent Technologies Inc.) and sequenced in an MiSeq Instrument

(Illumina, 2×150 bp). Sequencing data have been deposited at the European Genome-Phenome Archive (<http://www.ebi.ac.uk/ega/>), which is hosted at the European Bioinformatics Institute, under accession number EGAS00001004733.

The bioinformatic analysis was performed using an updated version of our previously validated pipeline (19). Synonymous and intronic variants were removed. Because of the lack of matched germ line DNA, potential polymorphisms were filtered out on the basis of public databases and by using a three-step algorithm designed to predict the somatic origin of the mutations (Supplementary Materials and Methods).

Molecular groups classification

The LymphGen probabilistic classification tool was used to classify our DLBCL cases into the recently described genetics subtypes (5). To this aim, we used the mutations identified in 79 cfDNA samples as well as *BCL2* and *BCL6* translocations. Because the A53 subtype is defined primarily by CNA, this subtype was excluded from the LymphGen classification algorithm in our series.

ctDNA quantitation

ctDNA levels were reported as haploid genome equivalents per mL of plasma (hGE/mL), determined as the product of total cfDNA concentration (fluorometry by Qubit, Thermo Fisher Scientific) and the mean allele fraction of somatic mutations (Supplementary Materials and Methods). This value was expressed as a base-10 logarithm (log hGE/mL). We used the 2.5 hGE/mL threshold to classify patients into low or high ctDNA amount as published previously (12).

²[18F]Fluoro-2-deoxy-D-glucose-PET/CT parameters

TMTV was calculated by adding up the metabolic volumes of all nodal and extranodal lesions. TLG was calculated as the sum of the product of the metabolic volume of each local tumor based on its SUVmean. Quantitative analysis of TMTV was performed using the semiautomatic MIM software and supervised by X. Setoain, S. Rodríguez, M. Simó, and S. Casanueva-Eliceiry, with a fixed SUV > 2.5 thresholding method for segmentation. According to previous publications, the optimal cutoff to classify into low and high TMTV was established as 400 cm³ (20, 21).

Statistical analysis

We used standard definitions for complete response (CR), PFS, and OS (18). χ^2 method was used for categorical variables and Student *t* test for continuous variables. Nonparametric tests were applied when necessary. Logistic regression was used to select the best variables predicting CR. Actuarial survival analysis was performed by the Kaplan-Meier method and differences were assessed by the log-rank test. The optimal cut-off point for TLG for PFS was determined by using the maximally selected rank statistics (maxstat R package). Multivariate Cox regression analysis was used to assess the independent prognostic impact of different variables in terms of PFS and OS. Only patients treated with curative intent were included in the prognostic analyses. *P* < 0.05 was considered statistically significant. Statistical analyses were carried out using R (version 3.6.2; R Foundation).

Results

Clinical features, treatment, and outcome of the patients

cfDNA could be obtained from 85 of the 100 (85%) patients prospectively diagnosed with DLBCL during the period of the study.

The failure to obtain DNA was due to start of treatment prior to sample extraction (*n* = 13) and concomitant diagnosis of a second neoplasm (*n* = 2). Moreover, in six additional cases, the mutational profile could not be assessed because of the low amount of cfDNA (*n* = 2) or other technical issues (*n* = 4; Supplementary Fig. S1). Finally, the mutational landscape was assessed in 79 patients, whose main clinicobiological characteristics are listed in **Table 1**. Fifty-four percent of patients had stage IV disease, including 27% with bone marrow infiltration, and 48.5% showed high-intermediate- or high-risk IPI. After first-line treatment, 59 (75%) patients achieved a CR, 4 (5%) patients achieved a partial response, and 16 (20%) were refractory, including 7 early deaths. Among CR patients, 6 of 59 (7%) eventually relapsed at a median of 14 months from CR achievement (range, 10–20 months). Patients not included in the cfDNA analyses showed significant differences in terms of initial features (they were older, had a higher risk IPI, and a poorer PS) and outcome, with a lower CR rate and shorter PFS and OS (Supplementary Table S2).

Mutational profile assessed in cfDNA

The mean coverage of the cfDNA samples was $329 \times$ (range, $91 \times$ – $737 \times$) with more than 80% of the target regions covered at $>100 \times$ in 75% of the samples. At least one mutation was detected in 69 of 79 cases (87.3%; Supplementary Table S3). The median number of mutations per sample was six (range, 0–41) and the mean allele fraction was 26% (range, 2.4%–58.6%; Supplementary Table S4). **Figure 1** shows the mutational profile of the series, restricted to genes mutated in more than 5% of the cases. The most frequently mutated genes were *KMT2D*, *BCL2*, *TP53*, *TNFRSF14*, *MYD88*, *CREBBP*, *EP300*, *SOC1*, *MYC*, and *PIM1* (the complete list of mutations is detailed in Supplementary Table S3). The distribution according to COO, MYC and BCL2 double expression, MYC, BCL2, and BCL6 rearrangement, and double-hit status is also shown in **Fig. 1**. Moreover, we were able to classify 43% of the cases according to the genetic subtypes proposed by Wright and colleagues (5), as detailed in Supplementary Fig. S2.

Validation of mutations in tissue biopsies

To validate the cfDNA mutational analysis, we performed targeted NGS in 45 paired FFPE samples. Mean percentage of tumor content was 80% (range, 30%–100%). The mean coverage in these samples was $509 \times$ (range, $77 \times$ – $1,050 \times$). In 28 of 45 cases (62%), the majority ($\geq 69\%$) of the mutations were observed both in the cfDNA and FFPE samples. In the remaining 17 cases, the number of mutations identified in cfDNA was lower than that observed in the paired FFPE samples. In 10 cases, additional mutations were only detected in cfDNA compared with gDNA (**Fig. 2**). The sensitivity of cfDNA to detect the mutations present in paired FFPE samples was 68% [95% confidence interval (CI), 56.2–78.7]. When we considered mutated genes instead of individual mutations, cfDNA genotyping was able to detect 71% of mutated genes. When taking into account only the mutations present with $>20\%$ allelic frequency in the FFPE samples, we detected up to 77% of the mutations in cfDNA. Of note, most cases in which mutations could not be detected in the cfDNA corresponded to localized stages [mutations were detected in 3/14 (21%) localized stages vs. 24/30 (80%) of disseminated stages; *P* < 0.001]. In addition, among the four cases in which cfDNA sample was obtained after excisional biopsy of the primary tumor, in two of these cases less than 50% of mutations observed in the paired FFPE sample could be detected in the cfDNA, while none of the mutations were detected in the remaining two cases.

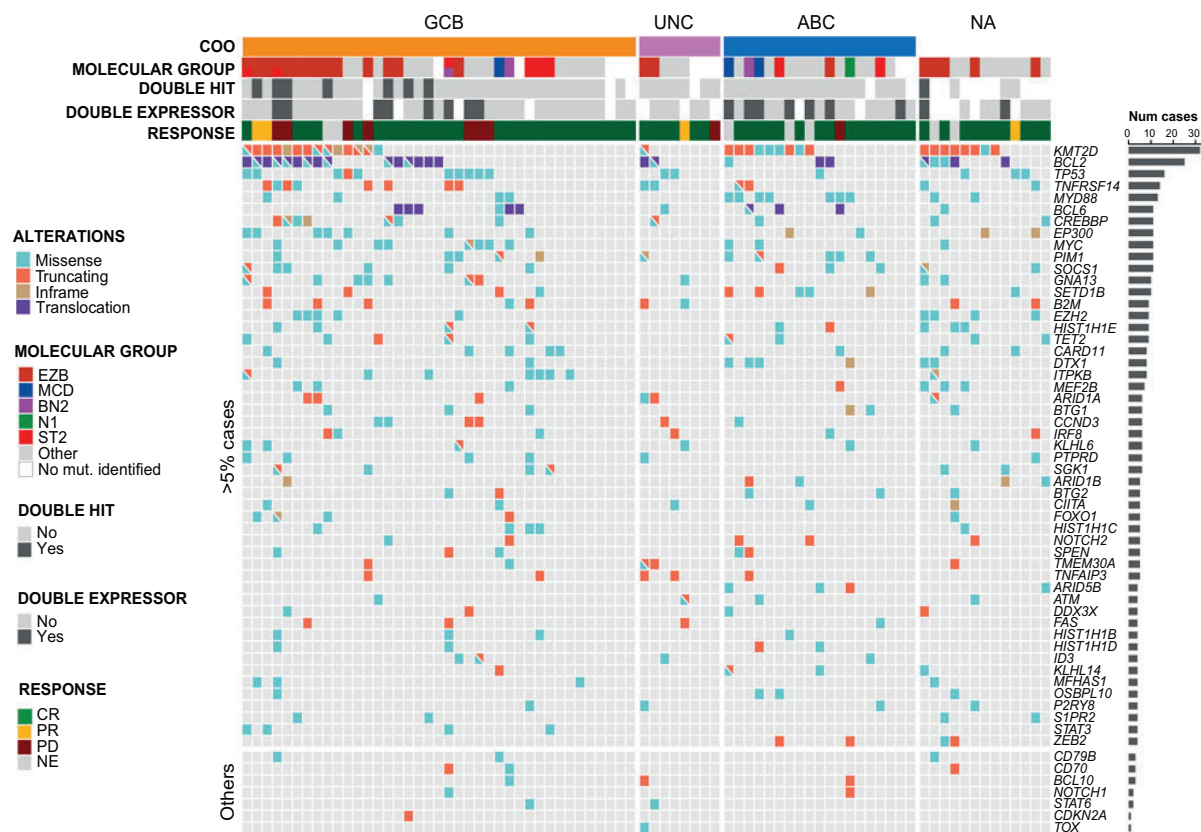


Figure 1.

Mutational profile in cfDNA of the 79 patients with DLBCL. Each column represents one tumor sample, and each row represents one gene. Molecular groups; MYC and BCL2 double expression; MYC, BCL2, and BCL6 rearrangement; double-hit status; and response to first-line treatment are also shown. Cases are grouped by COO.

Tumor burden assessment

ctDNA

The median amount of ctDNA was 2.64 log hGE/mL (range, 1.29–4.27). Higher quantity of ctDNA significantly correlated with the presence of B symptoms, elevated LDH and β 2-microglobulin serum levels, advanced Ann Arbor stage, and high-risk IPI ($P < 0.05$ in all cases; Fig. 3A; Supplementary Table S5). However, there was no significant correlation between the amount of ctDNA and the presence of bulky mass or primary extranodal disease. Of note, the number of detected mutations was not related to the amount of ctDNA (mean, 7.2 vs. 7.8 for low and high ctDNA, respectively).

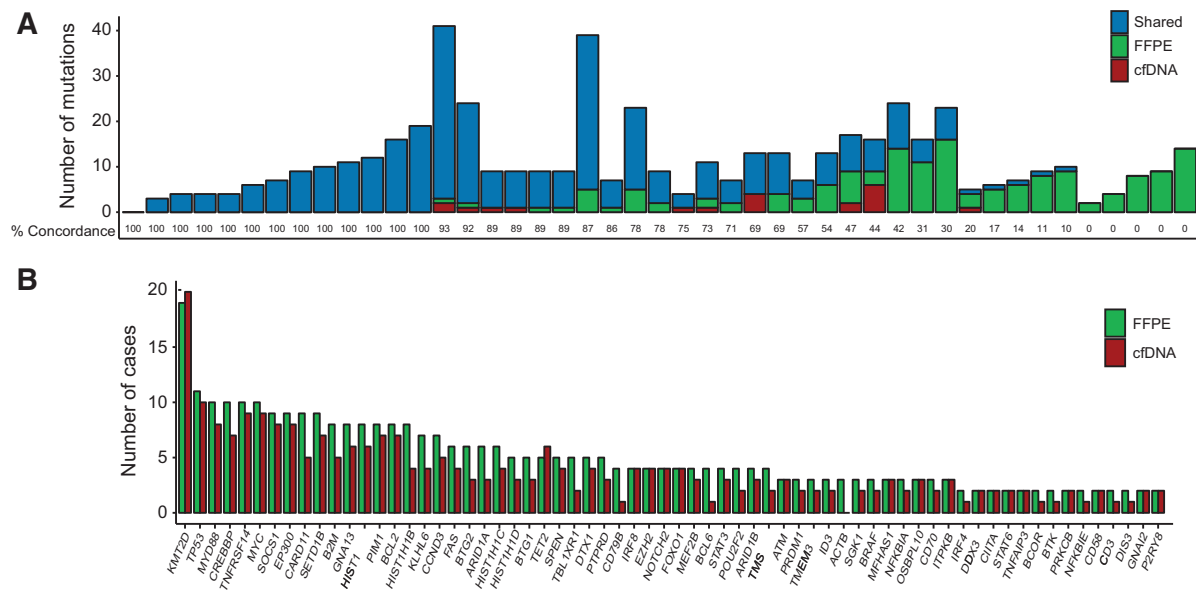
PET/CT

Volumetric PET/CT determinations could be assessed in 63 cases. Median pretreatment TMTV was 207 cm³ (range, 0–4,171 cm³), whereas median TLG was 1,525 (range, 0–26,295). As expected, high TMTV and TLG correlated with bulky disease, presence of B symptoms, elevated LDH serum levels, β 2-microglobulin, advanced stage, and IPI ($P < 0.05$ in all the cases; Supplementary Table S5). The ctDNA concentration significantly correlated with the TMTV ($R = 0.56$; $P < 0.001$) and TLG ($R = 0.43$; $P < 0.001$), confirming that ctDNA measurements are related to the lymphoma tumor burden (Fig. 3B). The optimal cutoff for PFS as determined by maxstat for TLG was 7,898.

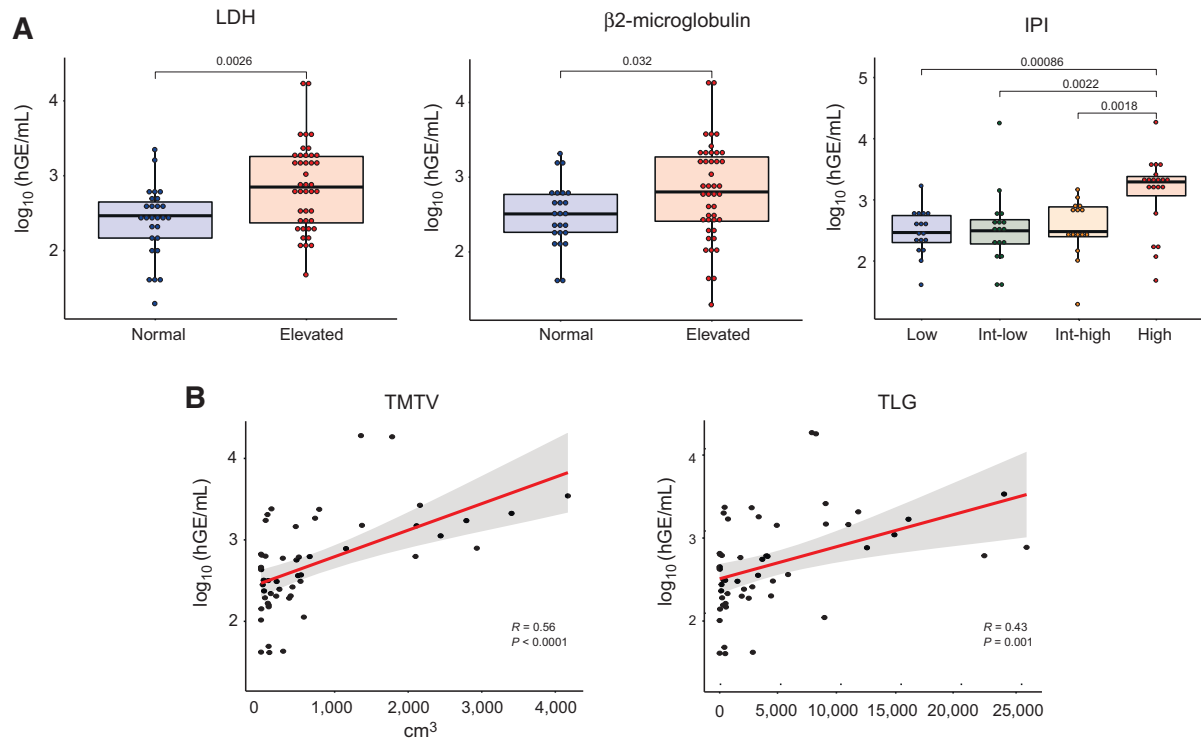
Impact of initial variables, including mutational profile and tumor burden, on response and outcome

Initial variables predicting the achievement of a CR in the 69 patients treated with curative intent included poor ECOG PS, advanced stage (III–IV), elevated LDH and β 2-microglobulin, and high-intermediate- or high-risk IPI (all $P < 0.05$; Supplementary Table S6). The following single mutations predicted a low CR rate: SETD1B, CIITA, and FOXO1 ($P < 0.03$). The previously described genetic subtypes and the number of mutations did not predict CR. We also examined the impact of pretreatment ctDNA levels on outcome, using 2.5 log hGE/mL of ctDNA as threshold. Patients with high ctDNA levels had a significantly lower CR rate than those with low ctDNA levels (65% vs. 96%, respectively; $P < 0.004$). Patients with high TMTV and TLG also had a significantly lower CR rate (TMTV, 56% vs. 97%; $P < 0.001$ and TLG, 36% vs. 94%; $P < 0.001$). In a multivariate analysis, including IPI, ctDNA amount, and TMTV, only TMTV (HR, 0.56; $P = 0.009$) maintained its predictive value for CR achievement in the final model with 50 cases.

Clinical variables associated with a shorter PFS in the univariate analysis were: high serum LDH and β 2-microglobulin, double expression of MYC and BCL2, advanced stage, and high-risk IPI (Table 2; Fig. 4A). Mutations of the following genes were related to a poor PFS: CIITA, SETD1B, OSBP10, and MYC ($P < 0.05$). Patients with high ctDNA levels had a significantly inferior 24-

**Figure 2.**

Concordance between mutations detected in cfDNA and matched tumor gDNA. **A**, Number of mutations by case. Mutations are coded by color according to whether they were detected in both samples (blue), only in the FFPE samples (green), or in cfDNA (red). The percentage of concordance is shown for each case. **B**, Prevalence of somatic mutations detected by NGS in plasma and gDNA.

**Figure 3.**

Correlation between pretreatment ctDNA and tumor burden parameters. **A**, Box plot showing the relationship between pretreatment ctDNA levels and serum LDH, serum $\beta 2$ -microglobulin, and IPI. Each dot corresponds to one sample. **B**, ctDNA correlation with TMTV and TLG. Int, intermediate.

Table 2. CR rate, PFS, and OS according to parameters reflecting tumor burden in the 69 patients with DLBCL treated with curative intent.

Variable	N	CR (%)	2-year PFS	2-year OS
Bulky disease				
No	52	43 (83)	75	86
Yes	17	12 (71)	61	88
LDH				
Normal	30	29 (97) ^a	84 ^a	97 ^a
>ULN	39	26 (67)	63	79
β2-microglobulin				
Normal	30	30 (100) ^a	88 ^a	100 ^a
>ULN	39	24 (63)	61	76
IPI				
Low/intermediate-low	39	36 (92) ^a	83 ^a	97 ^a
Intermediate-high/high	30	19 (63)	60	73
ctDNA				
Low	25	24 (96) ^a	85 ^a	100 ^a
High	34	22 (65)	65	73
TMTV				
Low	35	34 (97) ^a	80 ^a	94 ^a
High	25	14 (56)	56	75
TLG				
Low	46	43 (94) ^a	81 ^a	91
High	14	5 (36)	36	71

Abbreviation: ULN, upper limit of normal.

^a*P* < 0.05.

month PFS than those with low levels (65 vs. 85%, respectively; *P* = 0.038; **Fig. 4B**). Higher TMTV and TLG predicted for a lower 24-month PFS (TMTV, 56% vs. 80%; *P* = 0.012 and TLG, 36% vs. 81%; *P* < 0.001; **Table 2**; **Fig. 4C**). A multivariate analysis was performed, including IPI, ctDNA (low vs. high), and TMTV (low vs. high). In the final model with 50 patients, only TMTV [HR, 3.32 (95% CI, 1.22–9.0); *P* = 0.018] retained independent prognostic value for PFS (Supplementary Fig. S3).

Nine patients eventually died during follow-up, with a 24-month OS of 86% (95% CI, 79%–93%). Initial variables predicting OS were older age (>60 years), poor ECOG PS, presence of B symptoms, extranodal involvement, advanced stage, high β2-microglobulin serum levels, higher IPI, double expression of MYC and BCL2, high ctDNA level, and TMTV (all *P* < 0.05). *PIM1*, *FOXO1*, *DTX1*, *CIITA*, *SETD1B*, *OSBPL10*, and *MYC* mutations were associated with poor OS (*P* < 0.05). Patients with high ctDNA levels had a significantly inferior 24-month OS than those with low levels (73% vs. 100%, respectively; *P* = 0.007; **Fig. 4B**). Higher TMTV, but not TLG, predicted for a poorer 24-month OS (TMTV, 75% vs. 94%; *P* = 0.0478 and TLG, 71% vs. 91%; *P* = 0.071; **Table 2**; **Fig. 4C**).

Discussion

Liquid biopsy, particularly cfDNA, has been increasingly used for a wide variety of applications in oncology, including diagnosis, prognosis, and the identification of therapeutic targets (6). In addition, ctDNA provided information regarding tumor burden with a good correlation with other clinical parameters and the metabolically active tumor mass as assessed by PET (12, 22).

We have conducted a population-based prospective study showing that cfDNA is a reliable source for DLBCL genotyping. Although the study was designed to enroll all cases consecutively diagnosed with

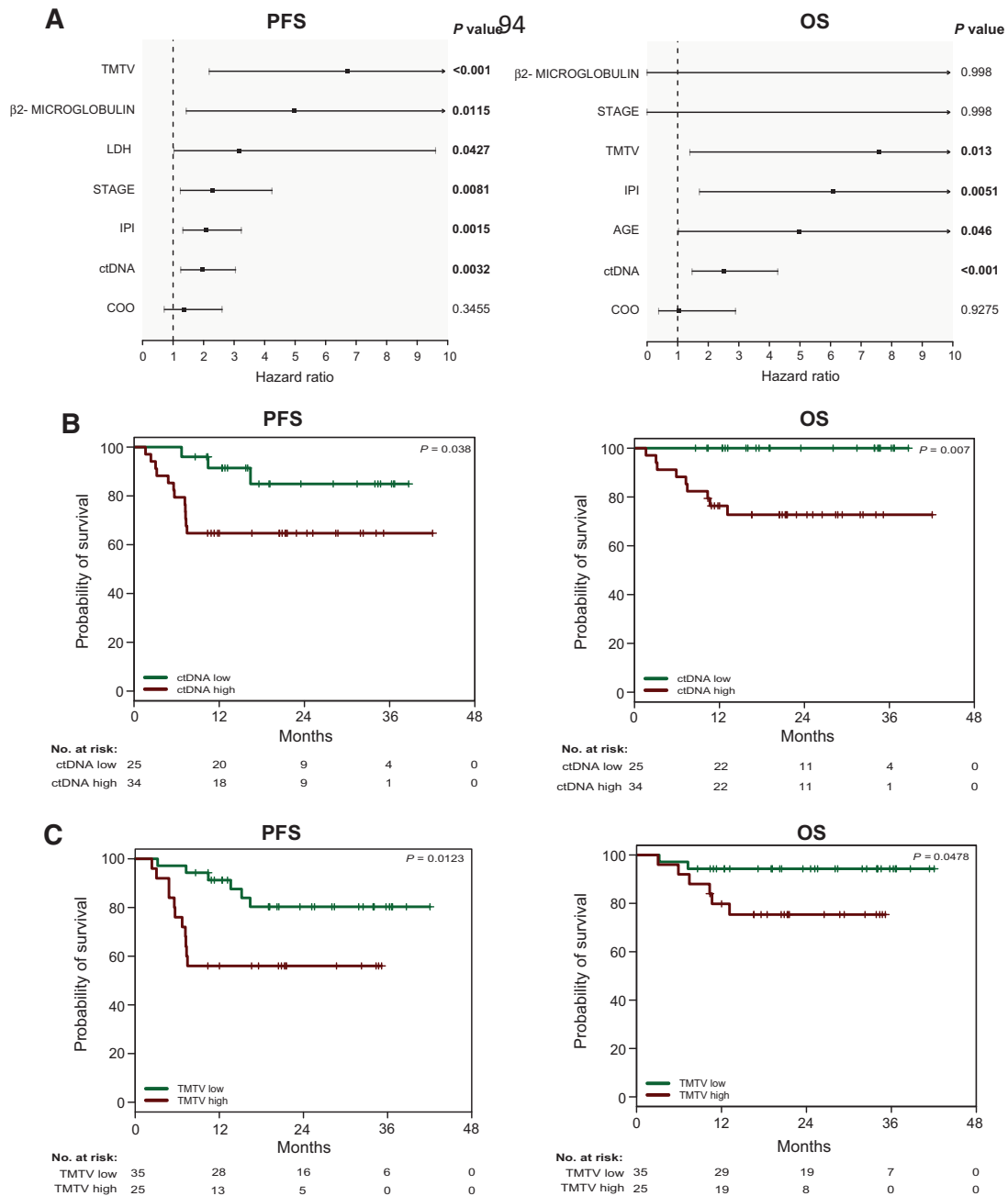
DLBCL at a single institution, 15% of the potential candidates could not be included, mostly due to the start of treatment before sampling. Of note, these cases corresponded to a high-risk population, with poor initial features, low CR rates, and unfavorable outcome. Obviously, this represents a bias in an attempted “real-life” study. Nevertheless, it is likely that this bias is also present in previous studies based on retrospective series (9, 12).

One of the aims of this study was the assessment of ctDNA to objectively estimate tumor burden. We have confirmed that baseline ctDNA levels are significantly associated with well-described clinical parameters of tumor burden, including serum LDH and IPI, and also with β2-microglobulin level and advanced stage, which were not clearly associated in previous series (7, 11, 12). The prognostic value of PET has been demonstrated in different lymphoma subtypes, particularly by using quantitative assessment of TMTV and TLG (13). We have confirmed the prognostic value of these two factors in this cohort. Furthermore, a correlation between baseline ctDNA levels and TMTV was observed, indicating that ctDNA levels might be a surrogate for tumor burden. Kurtz and colleagues (12) showed that pretreatment ctDNA levels and molecular responses both after first-line and salvage therapy were independent prognostic markers. Using the same cutoff, we observed that patients with high ctDNA levels had significantly inferior 24-month PFS (65% vs. 85%; *P* = 0.038) and OS rates (73% vs. 100%; *P* = 0.007) than those with low levels. To our knowledge, this is the first confirmation of this finding in a larger prospective single-center series. Finally, the multivariate analysis showed that TMTV, but not ctDNA, retained independent prognostic impact on PFS. Although this is somewhat different from previous studies (12, 22), it is not surprising because both ctDNA and TMTV likely reflect the active mass of the tumor. Considering the relatively small number of cases included in this multivariate analysis, larger studies are needed to confirm the potential independent prognostic value of these highly correlated measurements and to further clarify the role of ctDNA in the clinical setting.

Median TMTV was lower than in previous series (20, 21). The median value is crucially dependent on the segmentation method, the patient population characteristics, and the efficacy of treatment. There is no agreement on the best method. We employed the SUV ≥2.5 method, which according to previous reports has the best interobserver agreement and is the easiest to apply (20). Mikhael and colleagues (21) analyzed the prognostic value of quantitative PET measurements, particularly metabolic tumor burden, in a retrospective study including 147 consecutive patients treated with R-CHOP at a single institution. They used an in-house software to automatically segment tumor volumes with SUV ≥ 2.5. Median TMTV of this series was 592 cm³; however 40% of the patients had bulky disease at diagnosis and 68% of patients had stage III–IV.

Previous studies have shown that cfDNA could provide an accurate picture of the genetic landscape of lymphoproliferative disorders. This is of great interest since the expansion of NGS has highlighted the importance of gene mutations and CNA beyond the COO and FISH alterations. In fact, new genetic classifications that incorporate such data have been recently proposed, with the objective of grouping the patients according to common mechanisms of lymphomagenesis susceptible of potential specific target therapies (3–5). Indeed, cfDNA might be useful not only at diagnosis when tissue biopsy is mandatory, but also at relapse when excision biopsy is frequently unavailable.

At least one mutation was detected in plasma in the majority (87%) of the cases. This finding is consistent with previous publications, in which the rate of detection varied from 63% to 85% (7, 11). We also aimed to determine the reliability of the technique by comparing the

**Figure 4.**

Survival analysis of the 69 patients treated with curative intent. **A**, Results of the univariate analysis for PFS and OS. **B** and **C**, Kaplan-Meier estimates of PFS and OS according to pretreatment ctDNA levels and TMTV value.

information obtained from cfDNA with that from the tumor tissue. In our hands, the sensitivity of cfDNA to detect mutations present in the paired FFPE samples was 68%. This proportion increased to 71% when the number of mutated genes was taken into consideration, instead of the number of mutations. In a previous study, Rossi and colleagues (7) determined the basal genetic profile of DLBCL by ultra-deep targeted

NGS of 50 diagnostic plasma samples. They were able to detect in plasma, 83% of the mutations seen in the tissue biopsy in 18 paired cases. This slight difference could be explained by the lower sequencing coverage of our series (mean depth, $329 \times$ vs. $>1,000 \times$), together with a substantially higher number of tested genes ($N = 112$ vs. 59). In this regard, most of the biopsy mutations not detected in the cfDNA had a

low representation in the tissue suggesting that they could be present below the limit of detection in the cfDNA due to the low sequencing depth. In fact, when we considered only mutations with >20% allelic frequency in the tumor biopsy, we were able to detect up to 77% of the mutations in cfDNA. On the other hand, we observed that in localized stages or after excisional diagnostic procedures, the sensitivity of cfDNA to detect tumor mutations was significantly lower.

The mutational landscape described from cfDNA in our study was highly consistent with that previously published in different DLBCL series, including a different cohort from our institution (3, 4, 7, 23). It included genes with prognostic impact and related to targeted drugs, such as *TP53*, *MYD88*, *EZH2*, *NOTCH1*, *CD79B*, or *CREBBP* that could be relevant in the near future in the treatment of these patients. Note that we did not analyze CNA because of our NGS panel was not designed to capture regions effected by chromosomal alterations and the lack of baseline cfDNA samples to be used in the analyses. Recently, Wright and colleagues (5) proposed a new genetic system able to classify up to 63.1% of DLBCL cases (47.6% core cases, 9.8% extended cases, and 5.7% genetically composite cases). Applying this algorithm with the mutations identified in the cfDNA, we were able to classify 43% of our cases, providing evidence to use cfDNA as a source for molecular classification. The lower percentage of cases classified in our series could be explained by the limited number of genes studied together with the lack of information regarding CNA, which impaired the assessment of the entire classification proposed. This also might explain the fact that molecular classification had no significant impact on the response to treatment.

The identification of predictive biomarkers is an urgent need to allow a rational selection of the most effective therapies in the future clinical practice. It is proposed that the DLBCL genetic subtypes differ strikingly in their response to standard chemoimmunotherapy and may also respond differently to targeted therapies (5). In the last years, different agents have been combined with standard chemoimmunotherapy without an improvement in response or survival (24–26), although only COO classification was used. The incorporation of this molecular classification for treatment selection into the design of clinical trials, and eventually in the real-life setting, is a first step of improvement in the era of personalized medicine.

In summary, cfDNA was easily accessible and useful for estimating the tumor burden and tumor mutational profile in our prospective cohort of patients with DLBCL. Evaluating its relationship with the mutational burden or particular genetic profiles could provide decisive information to tailor therapeutic approaches.

Authors' Disclosures

A. Rivas-Delgado reports grants from Hospital Clinic de Barcelona during the conduct of the study. F. Nadeu reports personal fees from Janssen outside the submitted work. E. Campo reports grants from Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Ciencia y Universidades, CIBERONC, Generalitat de Catalunya, and European Union and the Canadian Institutes of Health Research during the conduct of the study and personal fees from Illumina outside the submitted work, as well as a patent for NanoString Technologies licensed. E. Giné reports grants from ISCIII during the conduct of the study, nonfinancial support and other from Janssen and Gilead/Kite, and nonfinancial support from Roche outside the submitted work. A.

López-Guillermo reports grants from ISCIII during the conduct of the study; grants and other from Roche, Celgene, and Gilead/Kite; and other from Novartis, Janssen, and Incyte outside the submitted work. No disclosures were reported by the other authors.

Authors' Contributions

A. Rivas-Delgado: Conceptualization, resources, data curation, formal analysis, funding acquisition, investigation, visualization, methodology, writing-original draft, project administration, writing-review and editing. **F. Nadeu:** Data curation, software, formal analysis, investigation, visualization, methodology, writing-original draft, writing-review and editing. **A. Enjuanes:** Conceptualization, formal analysis, supervision, validation, methodology, writing-original draft, writing-review and editing. **S. Casanueva-Eliceiry:** Data curation, software, investigation, methodology. **P. Mozas:** Data curation, investigation, writing-review and editing. **L. Magnano:** Resources, investigation, methodology, writing-review and editing. **N. Castrejón de Anta:** Resources, investigation, methodology. **J. Rovira:** Resources, data curation. **I. Dlouhy:** Resources, data curation. **S. Martín:** Resources, investigation. **M. Osuna:** Investigation. **S. Rodríguez:** Resources, methodology. **M. Simó:** Resources, formal analysis. **M. Pinyol:** Formal analysis, investigation, methodology. **T. Baumann:** Resources, data curation, methodology, writing-review and editing. **S. Bea:** Resources, data curation, methodology, writing-review and editing. **O. Balagué:** Validation, methodology. **J. Delgado:** Resources, methodology, writing-review and editing. **N. Villamor:** Supervision, visualization, methodology, writing-review and editing. **X. Setoain:** Data curation, software, validation, writing-review and editing. **E. Campo:** Supervision, funding acquisition, methodology, writing-review and editing. **E. Giné:** Conceptualization, resources, data curation, supervision, funding acquisition, visualization, methodology, writing-original draft, writing-review and editing. **A. López-Guillermo:** Conceptualization, resources, supervision, funding acquisition, visualization, writing-original draft, writing-review and editing.

Acknowledgments

This work was supported by the Instituto de Salud Carlos III, the Ministerio de Ciencia e Innovación, and the European Regional Development Fund "Una manera de hacer Europa" (grants PI16/00420 and PI19/00887 to A. López-Guillermo and E. Giné, and grants RTI2018-094274-B-I00 and SAF2016-81860-REDT to E. Campo); CIBERONC (grants CB16/12/00334 and CB16/12/00225); Acció instrumental de Programes de Recerca Orientats from Generalitat de Catalunya (grant SLT002/16/00374 to E. Campo and A. López-Guillermo); and the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme and the Canadian Institutes of Health Research (grant 825835 to E. Campo). A. Rivas-Delgado was supported by a "Josep Font" grant of Hospital Clinic de Barcelona. F. Nadeu was supported by a predoctoral fellowship of the Ministerio de Ciencia e Innovación (grant BES-2016-076372). P. Mozas was supported by "Becas de Investigación de la Fundación Española de Hematología y Hemoterapia". J. Delgado was a recipient of a grant from the Generalitat de Catalunya (grant PERIS IPFE SLT006/17/301). E. Campo is an Academia Researcher of the "Institut Catalana de Recerca i Estudis Avançats" (ICREA) of the Generalitat de Catalunya. The authors acknowledge the support of the CERCA Program from Generalitat de Catalunya. They are indebted to the Genomics core facility of the Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS) for their technical help. They are grateful to V. Arellano and S. Ruiz for their support. This work was partially developed at the Centre Esther Koplowitz (CEK), Barcelona, Spain.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Received July 2, 2020; revised August 29, 2020; accepted October 26, 2020; published first October 29, 2020.

References

1. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. 4th ed. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer (IARC); 2017.
2. Scott DW, Wright GW, Williams PM, Lih C-J, Walsh W, Jaffe ES, et al. Determining cell-of-origin subtypes of diffuse large B-cell lymphoma using gene expression in formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *Blood* 2014;123:1214–7.
3. Schmitz R, Wright GW, Huang DW, Johnson CA, Phelan JD, Wang JQ, et al. Genetics and pathogenesis of diffuse large B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 2018; 378:1396–407.

4. Chapuy B, Stewart C, Dunford AJ, Kim J, Kamburov A, Redd RA, et al. Molecular subtypes of diffuse large B cell lymphoma are associated with distinct pathogenic mechanisms and outcomes. *Nat Med* 2018;24:679–90.
5. Wright GW, Huang DW, Phelan JD, Coulibaly ZA, Roulland S, Young RM, et al. A probabilistic classification tool for genetic subtypes of diffuse large B cell lymphoma with therapeutic implications. *Cancer Cell* 2020;37:551–568.e14.
6. Heitzer E, Haque IS, Roberts CES, Speicher MR. Current and future perspectives of liquid biopsies in genomics-driven oncology. *Nat Rev Genet* 2019;20:71–88.
7. Rossi D, Diop F, Spaccarotella E, Monti S, Zanni M, Rasi S, et al. Diffuse large B-cell lymphoma genotyping on the liquid biopsy. *Blood* 2017;129:1947–57.
8. Scherer F, Kurtz DM, Newman AM, Stehr H, Craig AFM, Esfahani MS, et al. Distinct biological subtypes and patterns of genome evolution in lymphoma revealed by circulating tumor DNA. *Sci Transl Med* 2016;8:364ra155.
9. Roschewski M, Dunleavy K, Pittaluga S, Moorhead M, Pepin F, Kong K, et al. Circulating tumour DNA and CT monitoring in patients with untreated diffuse large B-cell lymphoma: a correlative biomarker study. *Lancet Oncol* 2015;16:541–9.
10. Kurtz DM, Green MR, Bratman SV, Scherer F, Liu CL, Kunder CA, et al. Noninvasive monitoring of diffuse large B-cell lymphoma by immunoglobulin high-throughput sequencing. *Blood* 2015;125:3679–87.
11. Bohers E, Viailly PJ, Becker S, Marchand V, Ruminy P, Maingonnat C, et al. Non-invasive monitoring of diffuse large B-cell lymphoma by cell-free DNA high-throughput targeted sequencing: analysis of a prospective cohort. *Blood Cancer J* 2018;8:74.
12. Kurtz DM, Scherer F, Jin MC, Soo J, Craig AFM, Esfahani MS, et al. Circulating tumor DNA measurements as early outcome predictors in diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 2018;36:2845–53.
13. Cottreau AS, Lanic H, Mareschal S, Meignan M, Vera P, Tilly H, et al. Molecular profile and FDG-PET/CT total metabolic tumor volume improve risk classification at diagnosis for patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Clin Cancer Res* 2016;22:3801–9.
14. Song MK, Chung JS, Shin HJ, Lee SM, Lee SE, Lee HS, et al. Clinical significance of metabolic tumor volume by PET/CT in stages II and III of diffuse large B cell lymphoma without extranodal site involvement. *Ann Hematol* 2012;91:697–703.
15. Sasanelli M, Meignan M, Haioun C, Berriolo-Riedinger A, Casasnovas RO, Biggi A, et al. Pretherapy metabolic tumour volume is an independent predictor of outcome in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2014;41:2017–22.
16. Rivas-Delgado A, Magnano L, Moreno-Velázquez M, García O, Nadeu F, Mozas P, et al. Response duration and survival shorten after each relapse in patients with follicular lymphoma treated in the rituximab era. *Br J Haematol* 2019;184:753–9.
17. Tilly H, Gomes da Silva M, Vitolo U, Jack A, Meignan M, Lopez-Guillermo A, et al. Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2015;26:v116–25.
18. Cheson BD, Fisher RI, Barrington SF, Cavalli F, Schwartz LH, Zucca E, et al. Recommendations for initial evaluation, staging, and response assessment of Hodgkin and non-Hodgkin lymphoma: the Lugano classification. *J Clin Oncol* 2014;32:3059–3067.
19. Nadeu F, Delgado J, Royo C, Baumann T, Stankovic T, Pinyol M, et al. Clinical impact of clonal and subclonal TP53, SF3B1, BIRC3, NOTCH1, and ATM mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2016;127:2122–30.
20. Ilyas H, Mikhael NG, Dunn JT, Rahman F, Möller H, Smith D, et al. Defining the optimal method for measuring baseline metabolic tumour volume in diffuse large B cell lymphoma. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2018;45:1142–54.
21. Mikhael NG, Smith D, Dunn JT, Phillips M, Möller H, Fields PA, et al. Combination of baseline metabolic tumour volume and early response on PET/CT improves progression-free survival prediction in DLBCL. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2016;43:1209–19.
22. Delfau-Larue MH, Van Der Gucht A, Dupuis J, Jais JP, Nel I, Beldi-Ferchiou A, et al. Total metabolic tumor volume, circulating tumor cells, cell-free DNA: distinct prognostic value in follicular lymphoma. *Blood Adv* 2018;2:807–16.
23. Karube K, Enjuanes A, Dlouhy I, Jares P, Martin-Garcia D, Nadeu F, et al. Integrating genomic alterations in diffuse large B-cell lymphoma identifies new relevant pathways and potential therapeutic targets. *Leukemia* 2018;32:675–84.
24. Vitolo U, Witzig TE, Gascoyne RD, Scott DW, Zhang Q, Jurczak W, et al. ROBUST: first report of phase III randomized study of lenalidomide/R-CHOP (R 2 -CHOP) vs placebo/R-CHOP in previously untreated ABC-type diffuse large B-cell lymphoma. *Hematol Oncol* 2019;37:36–7.
25. Younes A, Sehn LH, Johnson P, Zinzani PL, Hong X, Zhu J, et al. Randomized phase III trial of ibrutinib and rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone in non-germinal center B-cell diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 2019;37:1285–95.
26. Davies A, Cummin TE, Barrans S, Maishman T, Mamot C, Novak U, et al. Gene-expression profiling of bortezomib added to standard chemoimmunotherapy for diffuse large B-cell lymphoma (REMoDL-B): an open-label, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2019;20:649–62.

Mutational Landscape and Tumor Burden Assessed by Cell-Free DNA in Diffuse Large B-Cell Lymphoma

Supplemental Materials

Supplementary Methods

1. Sample collection and processing
2. cfDNA extraction and quantification
3. Tumor genomic DNA/RNA extraction
4. Cell of origin determination
5. Library design for hybrid selection
6. Next generation sequencing
7. Bioinformatic analyses
8. Somatic *versus* germ line variants classification

Sample collection and processing

In all the cases, plasma samples for cell-free DNA (cfDNA) extraction were collected at diagnosis, before the start of treatment, using PAXgene Blood ccfDNA tubes (PreAnalytiX, Switzerland). In addition, in 45 selected cases genomic DNA from the paired diagnostic formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue biopsy was obtained. cfDNA was extracted from 2-4 mL of plasma using the QIAamp circulating nucleic acid kit (Qiagen, Germany). Genomic DNA and RNA were isolated from FFPE diagnostic tissue biopsies using the AllPrep DNA/RNA FFPE Kit (Qiagen, Germany) according to the manufacturer's instructions.

cfDNA extraction and quantification

Blood samples were centrifuged for 10 min at 1500g and subsequently for 1 minute at 20000 g. Plasma was aliquoted into 1mL in microtubes and stored at -80°C until extraction. cfDNA was extracted from 2-4 mL of plasma using the QIAamp circulating nucleic acid kit (Qiagen, Germany). The quantity and quality of the samples were assessed using Qubit High Sensitivity dsDNA (Thermo Fisher Scientific) and TapeStation (Agilent).

Levels of cfDNA are reported as haploid genome equivalents per mL of plasma (hGE/mL), determined as the product of total cell-free DNA concentration and the mean allele fraction of somatic alterations, and expressed as a base-10 logarithm (\log hGE/mL). We selected the 2.5 \log hGE/mL threshold for pretreatment cfDNA level according to previous publication¹.

Tumor genomic DNA/RNA extraction

Genomic DNA and RNA were isolated from FFPE diagnostic tissue biopsies. Five 10 μ m-thick sections per sample were used to extract RNA and DNA using the AllPrep DNA/RNA FFPE Kit (Qiagen, Germany) according to the manufacturer's instructions.

Cell of origin determination

The molecular cell of origin of the tumors was established using 200ng of RNA to determine gene expression levels by means of the Lymph2Cx assay (Nanostring technologies, Seattle, WA). Samples were hybridized to the custom codesets at 65°C overnight (15.5 to 22.5 hours). nCounter digital analyzer was used for fully automated imaging and data collection. Samples were classified

as GCB, ABC and Unclassified subtypes using the algorithm previously described².

Library design for hybrid selection

A targeted sequencing gene panel, including 112 genes (target region: 388Kb) that are recurrently mutated in DLBCL and other mature B-cell tumors, was specifically designed for this project (Supplementary Table S1). The design of the panel was carried out using capture tools as follows: 1) genes mutated in >5% of mature B-cell tumors, 2) genes associated with resistance to chemotherapy in mature B-cell tumors.

Next generation sequencing

Mutation profiles were generated using a custom hybridization capture-based panel strategy (compatible with cfDNA and DNA from FFPE samples) and subsequent sequenced in a MiSeq instrument (Illumina). Libraries were performed using 15-30 ng of cfDNA and 150 ng of gDNA from FFPE samples, following the procedure indicated by the manufacturer recommendations. Targeted sequencing was performed using molecular-barcoded library adapters using the ThruPLEX Tag-seq kit (Takara) and a hybridization capture based method (SureSelectXT-Agilent Technologies). The quality of the libraries was determined using the Bioanalyzer high sensitivity DNA kit (Agilent) and quantified by PCR using the KAPA library quantification kit (KAPA Biosystems). Finally, the libraries were pooled and sequenced 2x130 bp in the MiSeq instrument.

Bioinformatic analyses

Next-generation sequencing data for variant calling was analyzed using an updated version of our in-house pipeline³. Briefly, raw reads were trimmed using the SurecallTrimmer (v4.0.1, AGeNT, Agilent). Alignment of the trimmed reads was performed using BWA-mem algorithm (v0.7.17), PCR or optical duplicates were marked using MarkDuplicates from Picard (RRID: SCR_006525), and the base quality score recalibration was performed using GATK's BaseRecalibrator and ApplyBQSR functions (RRID: SCR_001876 v4.0). Variant calling was performed in parallel using VarScan2, Mutect2, VarDict, outLyzer, and freebayes. Only variants that were identified as "PASS" by at least 3 of the algorithms were considered. Finally, variants were annotated using snpEff/snpSift (v4.3t). Mutations were visually inspected on Integrative Genomics Viewer (IGV).

Somatic *versus* germ line variants classification

Variants reported in 1000 Genome Project, ExAC and/or gnomAD with a population frequency >1% were considered polymorphisms and automatically removed from the analysis. To further filter out non-recurrent polymorphisms, variants were only considered somatic if 1) they were not reported as germ line in our custom ICGC data base of 506 WGS/WES⁴; and were 2) truncating, or 3) predicted as potentially damaging by at least one of the following algorithms: CADD (phred score > 10), PolyPhen2 (score > 0.9), SIFT (score < 0.1) (RRID: SCR_012813), and/or MutationAssessor (score > 2) (RRID: SCR_005762). Next, we sequenced the non-tumoral DNA of 14 cases to assess the accuracy

of our somatic predictor method. In these 14 cases, our 3-step algorithm had a sensitivity of 93% and a specificity of 70%.

REFERENCES

- 1 Kurtz DM, Scherer F, Jin MC, Soo J, Craig AFM, Esfahani MS et al. Circulating Tumor DNA Measurements As Early Outcome Predictors in Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *J Clin Oncol*. 2018; 36: 2845–2853.
- 2 Scott DW, Wright GW, Williams PM, Lih C-J, Walsh W, Jaffe ES et al. Determining cell-of-origin subtypes of diffuse large B-cell lymphoma using gene expression in formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *Blood*. 2014; 123: 1214–1217.
- 3 Nadeu F, Delgado J, Royo C, Baumann T, Stankovic T, Pinyol M et al. Clinical impact of clonal and subclonal TP53, SF3B1, BIRC3, NOTCH1, and ATM mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2016; 127: 2122–2130.
- 4 Puente XS, Beà S, Valdés-Mas R, Villamor N, Gutiérrez-Abril J, Martín-Subero JI et al. Non-coding recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature*. 2015; 526: 519–524.

Figure S1. Consort diagram of patient flow through study

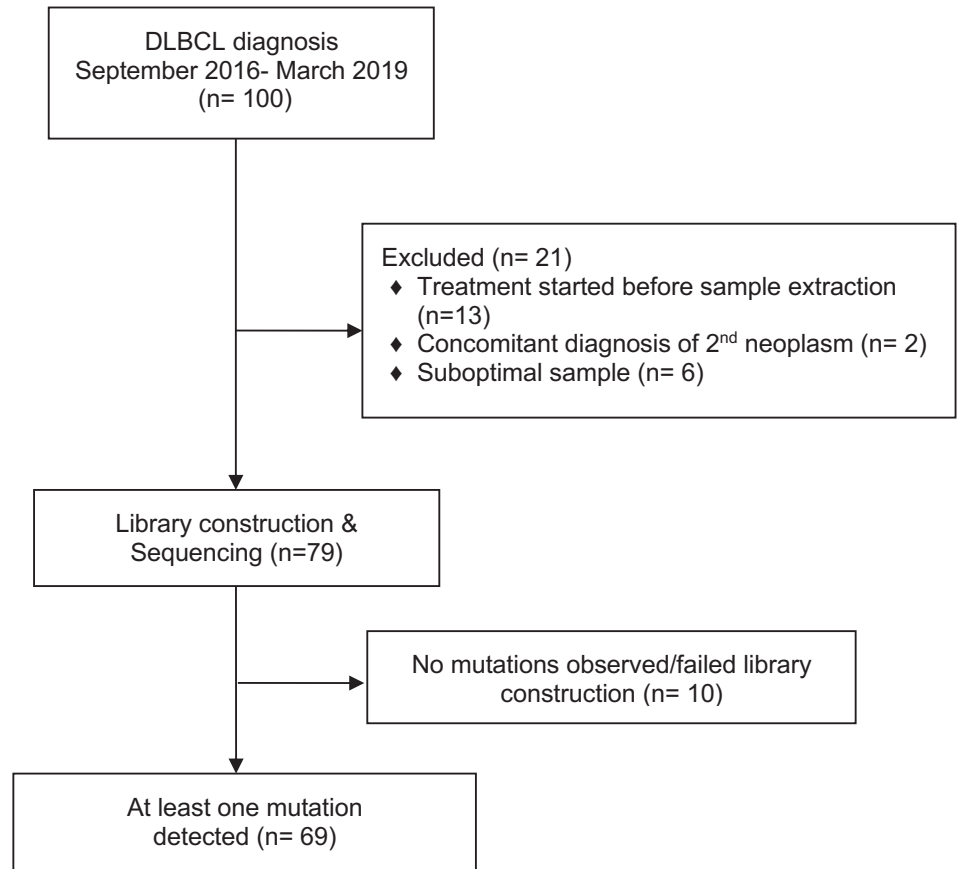


Figure S2. Mutational profile in cfDNA of the 79 patients with DLBCL according to the genetic subtypes.

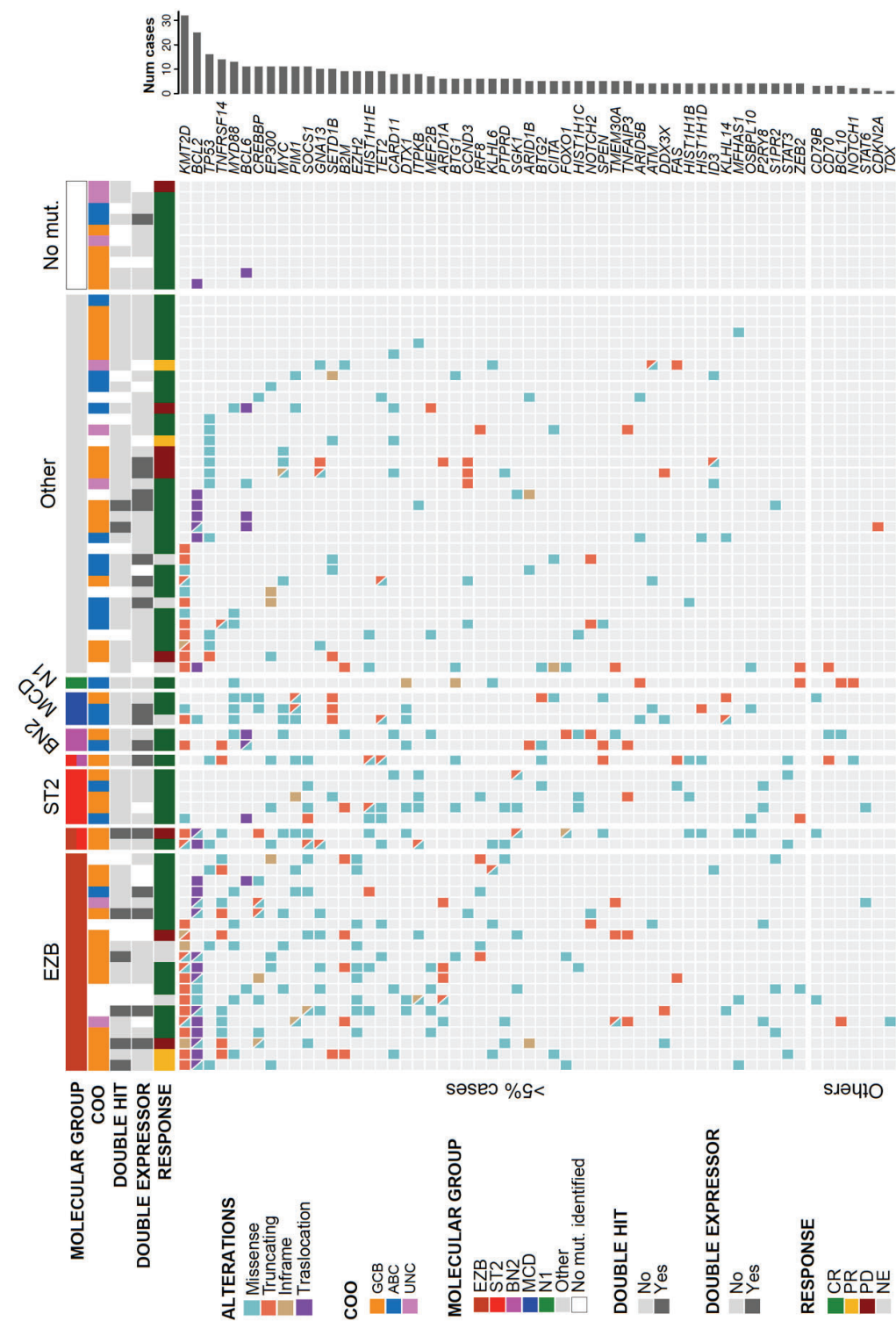
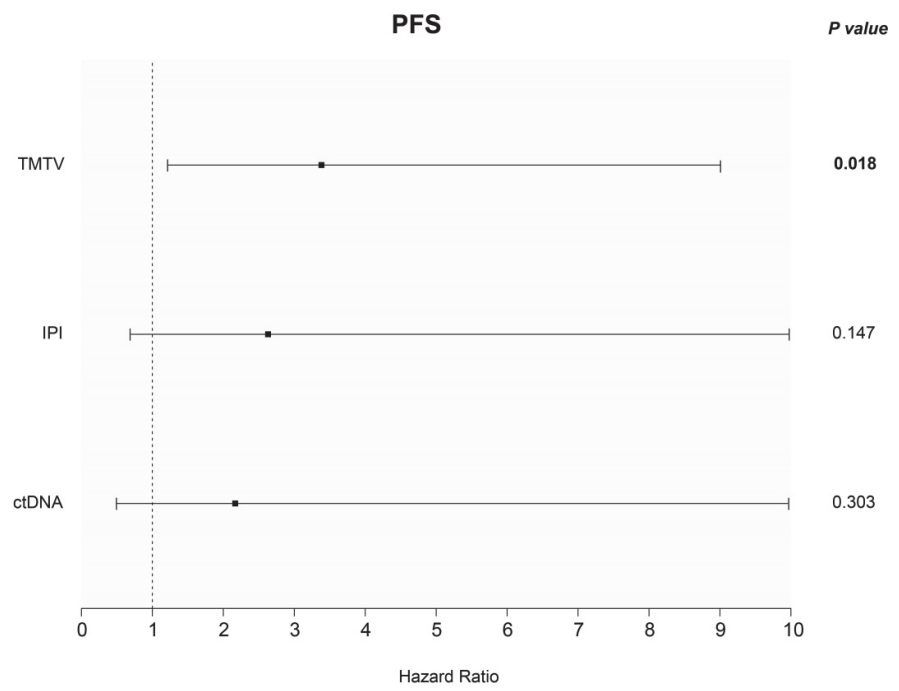


Figure S3. Results of the multivariate analyze for PFS



SEGUNDO TRABAJO

Cell-Free DNA for Genomic Analysis in Primary Mediastinal Large B-Cell Lymphoma

Alfredo Rivas-Delgado, Ferran Nadeu, Marcio Andrade-Campos, Cristina López, Anna Enjuanes, Pablo Mozas, Gerard Frigola, Lluís Colomo, Blanca Sanchez-Gonzalez, Neus Villamor, Silvia Beà, Elías Campo, Antonio Salar, Eva Giné, Armando López-Guillermo, Beatriz Bellosillo.

Diagnostics. 2022;12(7):1575.

Factor de Impacto JCR 2021: 3.992 (Q2)

RESUMEN SEGUNDO TRABAJO

La utilización de tecnologías basadas en secuenciación de nueva generación (NGS) ha permitido explorar la utilidad del DNA circulante tumoral (ctDNA) como marcador pronóstico y para la detección y caracterización genética de diferentes neoplasias, entre ellos los linfomas. Esta opción es particularmente útil cuando no se dispone de una muestra de biopsia del tumor para el análisis molecular, como ocurre con frecuencia en el linfoma de células grandes B primario del mediastino (LPM). El objetivo de este trabajo fue el evaluar el uso del ctDNA para la caracterización genómica en pacientes recién diagnosticados de LPM y su correlación con los parámetros clínicos.

En el presente estudio se incluyeron 20 pacientes diagnosticados de LPM según los criterios de la OMS en dos centros españoles entre 2015 y 2020. El único criterio de inclusión de los pacientes fue que dispusieran de una muestra de plasma para la extracción de ctDNA al momento del diagnóstico.

El perfil mutacional se pudo evaluar en ctDNA en 18/20 casos (M/H 11/7; mediana de edad 30 años). Todos los pacientes recibieron tratamiento con inmunquimioterapia, tras el cual 10 alcanzaron RC y 4 RP, mientras que 4 tuvieron progresión de la enfermedad. La sensibilidad del ctDNA para detectar las mutaciones presentes en las muestras pareadas de FFPE fue del 69% (95% IC: 60-78%). El perfil mutacional obtenido de las muestras de plasma fue altamente concordante con el descrito en la literatura. Los genes más recurrentemente mutados fueron *B2M* (61%), *SOCS1* (61%), *GNA13* (44%), *STAT6* (44%), *NFKBIA* (39%), *ITPKB* (33%) y *NFKBIE* (33%). Además, observamos una concordancia del 75% entre los microarrays de DNA y el low-pass WGS para detectar ganancias/pérdidas cromosómicas, con una concordancia de ambas técnicas notablemente mayor para las alteraciones clonales (18/20, 90%) en comparación con las alteraciones subclonales que se identificaron mayoritariamente en el tejido. No se observaron asociaciones significativas entre la cantidad de ctDNA y la carga tumoral o el pronóstico de los pacientes.

En conclusión, el ctDNA es una excelente fuente alternativa para la caracterización genética precisa de los pacientes con LPM.

Article

Cell-Free DNA for Genomic Analysis in Primary Mediastinal Large B-Cell Lymphoma

Alfredo Rivas-Delgado ^{1,2,3,*}, Ferran Nadeu ^{2,4}, Marcio Andrade-Campos ^{5,6}, Cristina López ^{2,4}, Anna Enjuanes ^{2,4}, Pablo Mozas ^{1,2}, Gerard Frigola ⁷, Luis Colomo ^{8,9}, Blanca Sanchez-Gonzalez ^{5,6}, Neus Villamor ^{2,4,7}, Sílvia Beà ^{2,3,4,7}, Elías Campo ^{2,3,4,7}, Antonio Salar ^{5,6,9}, Eva Giné ^{1,2,4}, Armando López-Guillermo ^{1,2,3,4} and Beatriz Bellosillo ^{6,8,9}

- ¹ Hematology Department, Hospital Clínic de Barcelona, 08036 Barcelona, Spain; mozas@clinic.cat (P.M.); eginé@clinic.cat (E.G.); alopezg@clinic.cat (A.L.-G.)
- ² Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), 08036 Barcelona, Spain; nadeu@clinic.cat (F.N.); clopez2@clinic.cat (C.L.); anna.enjuanes@idibaps.org (A.E.); villamor@clinic.cat (N.V.); sbea@clinic.cat (S.B.); ecampo@clinic.cat (E.C.)
- ³ Faculty of Medicine and Health Sciences, Universitat de Barcelona, 08007 Barcelona, Spain
- ⁴ Centro de Investigación Biomédica en Red de Cáncer (CIBERONC), 28029 Madrid, Spain
- ⁵ Hematology Department, Hospital del Mar-IMIM, 08003 Barcelona, Spain; 64138@parcdesalutmar.cat (M.A.-C.); bsanchezgonzalez@psmar.cat (B.S.-G.); asalar@psmar.cat (A.S.)
- ⁶ Grup de Recerca Clínica, Aplicada en Neoplàsies Hematològiques-Hospital del Mar-IMIM, 08003 Barcelona, Spain; bbellosillo@psmar.cat
- ⁷ Hematopathology Section, Pathology Department, Hospital Clínic de Barcelona, 08036 Barcelona, Spain; frigola@clinic.cat
- ⁸ Pathology Department, Hospital del Mar-IMIM, 08003 Barcelona, Spain; lcolomo@psmar.cat
- ⁹ Department of Medicine and Life Sciences, Universitat Pompeu Fabra, 08002 Barcelona, Spain
- * Correspondence: arivas@clinic.cat; Tel.: +34-932275428
- † These authors contributed equally to this work.



Citation: Rivas-Delgado, A.; Nadeu, F.; Andrade-Campos, M.; López, C.; Enjuanes, A.; Mozas, P.; Frigola, G.; Colomo, L.; Sanchez-Gonzalez, B.; Villamor, N.; et al. Cell-Free DNA for Genomic Analysis in Primary Mediastinal Large B-Cell Lymphoma. *Diagnostics* **2022**, *12*, 1575. <https://doi.org/10.3390/diagnostics12071575>

Academic Editors: Stefan Holdenrieder and Abel Bronkhorst

Received: 15 May 2022

Accepted: 27 June 2022

Published: 28 June 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: High-throughput sequencing of cell-free DNA (cfDNA) has emerged as a promising noninvasive approach in lymphomas, being particularly useful when a biopsy specimen is not available for molecular analysis, as it frequently occurs in primary mediastinal large B-cell lymphoma (PMBL). We used cfDNA for genomic characterization in 20 PMBL patients by means of a custom NGS panel for gene mutations and low-pass whole-genome sequencing (WGS) for copy number analysis (CNA) in a real-life setting. Appropriate cfDNA to perform the analyses was obtained in 18/20 cases. The sensitivity of cfDNA to detect the mutations present in paired FFPE samples was 69% (95% CI: 60–78%). The mutational landscape found in cfDNA samples was highly consistent with that of the tissue, with the most frequently mutated genes being *B2M* (61%), *SOCS1* (61%), *GNA13* (44%), *STAT6* (44%), *NFKBIA* (39%), *ITPKB* (33%), and *NFKBIE* (33%). Overall, we observed a 75% concordance to detect CNA gains/losses between DNA microarray and low-pass WGS. The sensitivity of low-pass WGS was remarkably higher for clonal CNA (18/20, 90%) compared to subclonal alterations identified by DNA microarray. No significant associations between cfDNA amount and tumor burden or outcome were found. cfDNA is an excellent alternative source for the accurate genetic characterization of PMBL cases.

Keywords: cell-free DNA; primary mediastinal large B-cell lymphoma; mutational profile; copy number analysis

1. Introduction

Primary mediastinal large B-cell lymphoma (PMBL) is recognized as a specific entity by the World Health Organization (WHO) classification, with particular clinical, histological, and molecular features. It accounts for 2% to 3% of all non-Hodgkin lymphomas [1]. Typically, patients present with a large mass in the anterior mediastinum, which often

makes it difficult to perform a biopsy. Occasionally, histological samples can initially be non-diagnostic due to extensive fibrosis and necrosis, leading to patients either undergoing mediastinoscopy or thoracoscopy to reach the diagnosis [2]. PMBL has recurrent genomic alterations, including somatic gene mutations and copy number alterations (CNA), as well as a characteristic gene expression profile. Constitutive activation of the nuclear factor- κ B (NF- κ B) and JAK/STAT pathways are recognized as a hallmark of this disease [3,4].

Cell-free DNA (cfDNA) has emerged as a noninvasive tool, complementary to tissue biopsies, particularly in cases in which a tumor biopsy is clinically difficult to obtain [5]. In Oncology, cfDNA has demonstrated its utility in monitoring the response to treatment real time, guiding therapy, and detecting early recurrence [6]. In recent years, cfDNA has been investigated in Hodgkin and non-Hodgkin lymphomas, using next-generation sequencing (NGS) for genetic analysis, providing a straightforward and easier detection method for assisting in the molecular profiling of tumors. In addition, cfDNA baseline levels have proven to be a remarkably useful tool to predict response to treatment and clinical outcomes [7]. Several studies of cfDNA in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) using NGS customized gene panels have shown that the mutational landscape from cfDNA samples was highly consistent with that observed in tissue biopsies, and also highlighted mutations only present in cfDNA, a fact that could be explained by the spatial heterogeneity of the tumor [8–11]. Although some of these studies include PMBL [9,11,12], the low number of cases analyzed and the lack of PMBL-specific analyses preclude any solid conclusion about the use of cfDNA for PMBL genomic characterization.

Genetic studies are difficult in PMBL mainly due to the scarce available material. This is particularly relevant both at diagnosis, when the biopsy is obtained by a large core needle leading to sufficient material for establishing a diagnosis but not for further analysis, and at relapse. In this setting, the use of cfDNA might overcome this limitation and become a reliable ground for genetic studies in PMBL. Thus, the aim of this study was to assess the use of cfDNA as a reliable source for genomic characterization using a custom NGS panel for gene mutations and low-pass whole-genome sequencing (WGS) for CNA in newly diagnosed patients with PMBL in a real-life setting and its correlation with clinical parameters.

2. Methods

2.1. Patients

Twenty-four patients were diagnosed with PMBL in two institutions between 2015 and 2020. Using the availability of plasma for cfDNA assessment, we selected the 20 cases with available plasma samples at diagnosis. The mutational profile could be evaluated in cfDNA in 18 cases with enough cfDNA quantity after extraction (at least 15 ng of cfDNA for library construction), which constituted the subjects of the present study.

Staging was performed according to standard procedures, including positron emission tomography/computed tomography (PET/CT) and unilateral bone marrow biopsy [13]. The main clinico-biological and follow-up characteristics were recorded and analyzed (variables studied are detailed in Supplementary Methods) (Table 1). All patients were treated with chemoimmunotherapy, including R-CHOP (rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone) or DA-EPOCH-R (dose-adjusted etoposide, prednisone, vincristine, cyclophosphamide, doxorubicin, and rituximab), followed by consolidative radiation therapy in selected cases (Table 1). Responses were assessed by end-of-therapy PET/CT according to standard guidelines [13].

2.2. Histologic Review

Cases were reviewed for the present study by G.F., L.C., and E.C. Morphological and immunohistochemical analyses were carried out according to the WHO classification [1] using the following markers: (1) B-cell differentiation antigens: CD10, CD19, CD20, CD22, CD23, CD79a, BCL6, and IRF4/MUM1, (2) T-cell antigens: CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, and CD45RO, and (3) cell proliferation and apoptosis: Ki67, CD30, and BCL2.

Table 1. Main baseline features, treatment, and response of the 18 patients with PMBL.

Characteristics	N (%)
Median age (range)	30 (19–68)
Female/Male	11/7 (61/39)
ECOG-PS ≥ 2	2 (11)
B symptoms	8 (44)
Stage	
I/II	12 (67)
III/IV	6 (33)
Bone marrow infiltration	0 (0)
Bulky mass (>7 cm)	14 (78)
Lactate dehydrogenase > normal	14 (78)
IPI	
Low risk	10 (56)
Low-Intermediate risk	5 (28)
High-Intermediate risk	2 (11)
High risk	1 (5)
Treatment	
R-CHOP	13 (72)
DA-R-EPOCH	5 (28)
Consolidative radiotherapy	10 (56)
Response to treatment	
Complete response	10 (56)
Partial response	4 (22)
Progressive disease	4 (22)

ECOG: Eastern Cooperative Oncology Group. IPI: International Prognostic Index. R-CHOP: rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone. DA-EPOCH-R: dose-adjusted etoposide, prednisone, cyclophosphamide, vincristine, doxorubicin, and rituximab.

2.3. Sample Collection and DNA Extraction

Plasma samples were collected at diagnosis, before the start of treatment, using EDTA tubes or PAXgene Blood ccfDNA tubes (PreAnalytiX, Hombrechtikon, Switzerland) and were processed within the first four hours after blood extraction (Supplementary Methods). cfDNA was extracted from 2–4 mL of plasma using the QIAamp circulating nucleic acid kit (Qiagen, Hilden, Germany) or the MagMax Cell Free DNA isolation kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). In parallel, genomic DNA (gDNA) was isolated from diagnostic formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue biopsies using the AllPrep DNA/RNA FFPE Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions.

Levels of cfDNA are reported as haploid genome equivalents per mL of plasma (hGE/mL), determined as the product of total cell-free DNA concentration and the mean allele fraction of somatic alterations, and expressed as a base-10 logarithm (log hGE/mL). We selected the 2.5 log hGE/mL threshold for pretreatment cfDNA level according to previous publication [12].

2.4. Mutational Profile and Copy Number Alterations

NGS was performed using a panel of 112 recurrently mutated genes in B-cell lymphoma as previously described (Supplementary Table S1) [10]. Briefly, libraries were performed with 15–30 ng of cfDNA and 150 ng of gDNA using molecular-barcoded library adapters (ThruPLEX Tag-seq kit; Takara, Tokyo, Japan) coupled with a custom hybridization capture-based method (SureSelect XT Target Enrichment System Capture strategy, Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA) and sequenced in a MiSeq instrument (Illumina, San Diego, CA, USA, 2 × 150 bp) (Supplementary Methods). The bioinformatic analysis was performed using our in-house NGS pipeline [10,14,15]. Synonymous and intronic variants, as well as potential polymorphisms, were removed from downstream analyses [10]. A detailed description on sample processing, library preparation, sequencing, and bioinformatic analysis can be found in the Supplementary Files.

Libraries for low-pass WGS were performed with the ThruPLEX Tag-seq kit using 30 ng of cfDNA in only two cases (cases 4 and 5) due to the availability of cfDNA for library constructions. Libraries were sequenced in a NextSeq550 (2×75 bp, Illumina) aiming at mean coverage of $0.5 \times$. Raw reads were mapped to the human reference genome (GRCh37) using the BWA-mem algorithm (v0.7.17) [16]. BAM files were generated, sorted, and indexed using samtools (v1.9) [17]. PCR duplicates were flagged using Picard tools (v2.17.0). FastQC (v0.11.5) and Picard tools were used to extract quality control metrics. Mean coverage was $0.97 \times$ [range 0.34 – $2.41 \times$]. CNA were extracted using ichorCNA (v0.3.2) [18] following authors' recommendations. Copy number neutral -loss of heterozygosity (CN-LOH) were not evaluated using low-pass WGS.

CNA were also analyzed from gDNA using the Affymetrix Genome-wide Oncoscan CNV FFPE arrays. Gains, losses and copy neutral loss of heterozygosity (CN-LOH) were evaluated using Nexus version 9.0 Discovery Edition software (Biodiscovery, El Segundo, CA, USA) using the GRCh37 human reference genome. CNA with a minimum size of 100 kb and telomeric CN-LOH larger than 10 Mb were considered.

2.5. Statistical Analyses

We used standard definitions for complete response (CR), progression-free survival (PFS), and overall survival (OS) [13]. The chi-square method was used to compare categorical variables and the Student's *t*-test for continuous variables. Non-parametric tests were applied when necessary. Logistic regression was used to select the best variables predicting for CR. Actuarial survival analysis was performed by the Kaplan–Meier method and differences were assessed by the log-rank test. Statistical analyses were carried out using R (version 3.6.3; R Foundation, Vienna, Austria).

3. Results

3.1. Detection of Genetic Alterations in cfDNA

cfDNA was obtained in 20 patients. However, as previously indicated, the mutational profile of two cases could not be assessed due to the low amount of cfDNA or low quality of DNA (one case each). Thus, the mutational landscape was finally assessed in 18 cases with a mean coverage of the cfDNA samples of $363 \times$ (range: 114 – $616 \times$). The median number of mutations per sample was 15 (range: 1–30). Figure 1 shows the mutational profile of all the patients, restricted to genes mutated in ≥ 2 cases (more than 10%). The most frequently mutated genes were *B2M* (61%), *SOCS1* (61%), *GNA13* (44%), *STAT6* (44%), *NFKB1A* (39%), *ITPKB* (33%), and *NFKBIE* (33%). The complete list of mutations is detailed in Supplementary Table S2.

3.2. Validation of Mutations in Tissue Biopsies

We performed targeted NGS in paired FFPE samples to validate the cfDNA mutational analysis. Sufficient DNA for library constructions could be obtained from FFPE samples in 9 out of 18 cases. The remaining 9 cases were excluded due to insufficient material for DNA extraction ($n = 6$) or insufficient quantity and/or quality for library preparation ($n = 3$).

The mean coverage in FFPE samples was $687 \times$ (range: 110 – $1520 \times$). In 7 out of 9 cases (78%), most mutations ($>80\%$) were observed both in the cfDNA and the FFPE samples. In the remaining 2 cases, the number of mutations identified in cfDNA was lower than that observed in the paired FFPE sample. Of note, these 2 cases corresponded to localized disease (Ann Arbor stage I). In 4 cases, additional mutations were only detected in cfDNA compared to gDNA (Figure 2). Overall, the sensitivity of cfDNA to detect the mutations present in paired FFPE samples was 69% (95% CI: 60–78%).

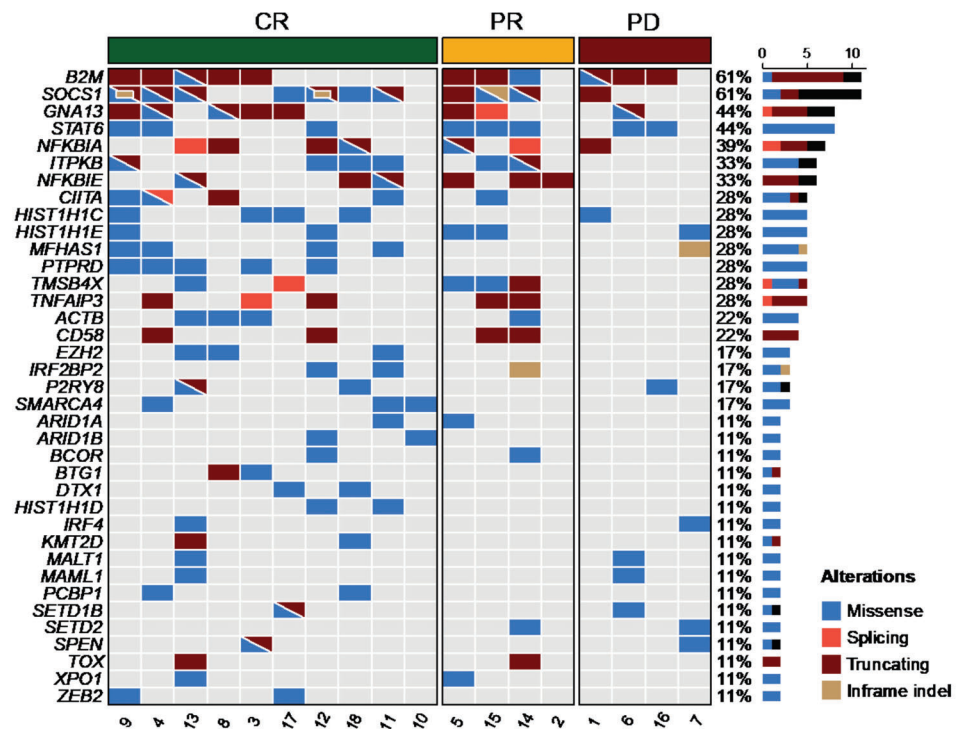


Figure 1. Mutational profile in the cfDNA of the 18 patients with PMBL. Each column represents one tumor sample, and each row represents one gene. Cases are grouped by response to first-line treatment.

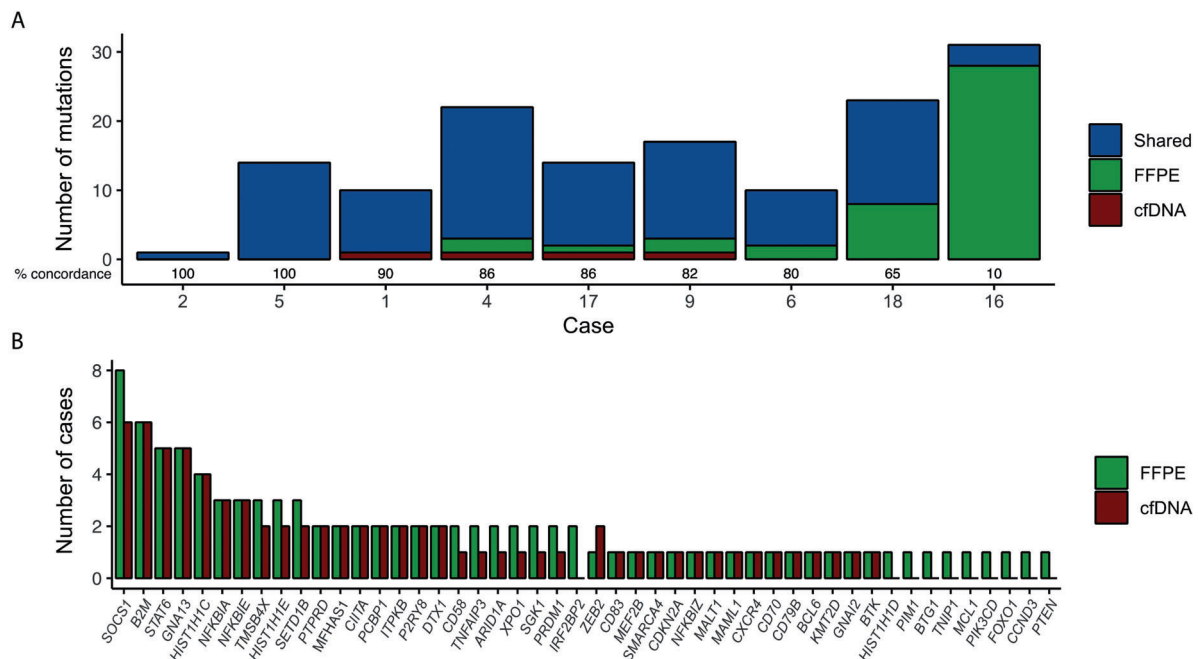


Figure 2. Concordance between mutations detected in cfDNA and matched tumor gDNA. (A) Number of mutations by case. Mutations are coded by color according to whether they were detected in both samples (blue), only in the FFPE sample (green), or only in cfDNA (red). The percentage of concordance is shown for each case; (B) Prevalence of somatic mutations detected by NGS in cfDNA and gDNA.

3.3. Copy Number Alterations

We investigated CNA using OncoScan arrays in 2 FFPE samples. Several CNA were detected in both samples, corresponding to a total of 8 and 16 alterations per case (Supplementary Table S3). In both cases, we observed gains of 5p, 7q, and trisomy 9, 21, and X, as well as losses of 7p. We compared the CNA results from the arrays with the CNA obtained from the low-pass WGS of cfDNA. Overall, we observed a 75% concordance to detect CNA between OncoScan and low-pass WGS. The sensitivity of low-pass WGS was remarkably higher for clonal CNA (18/20, 90%) compared to subclonal alterations identified by OncoScan (absolute probe median ≤ 0.1 ; 0/4 alterations) (Figure 3).

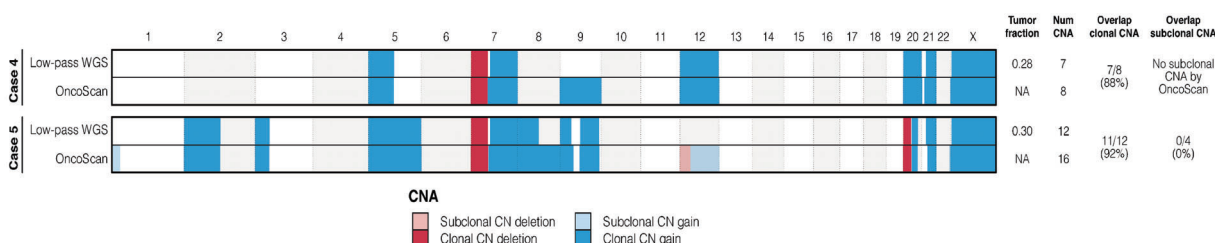


Figure 3. Copy number profile of primary mediastinal large B-cell lymphoma. The first line refers to CNA from cell-free DNA low-pass WGS, followed by the CNA of FFPE OncoScan. Chromosomes are sorted from 1 to X and p to q (chromosome Y was excluded). Gains and losses are depicted in blue and red, respectively. The subclonal CNA are highlighted by low color brightness.

3.4. Tumor Burden Assessment by cfDNA

The median amount of cfDNA was 2.65 log hGE/mL (range, 1.77–3.60). There was no significant association between the amount of cfDNA and the presence of B symptoms, elevated LDH, advanced Ann Arbor stage, or the presence of a bulky mass. Of note, the number of detected mutations did not correlate with the amount of cfDNA (mean 7.2 vs. 7.8 for low and high cfDNA, respectively).

3.5. Clinical Features, Treatment, and Outcome of the Patients

The main clinico-biological features of the 18 patients in whom mutational analyses were performed are listed in Table 1. Seventy-eight percent of patients had bulky disease, 33% had advanced stage (III/IV), and the majority (84%) showed low- or low-intermediate-risk International Prognostic Index. After frontline treatment, 10 (56%) patients achieved a CR, 4 (22%) partial response and 4 (22%) were refractory. None of the patients achieving a CR relapsed during follow-up. None of the initial clinical variables predicted for the obtention of a CR, nor did the total number of gene mutations. *PTPRD* mutation predicted for a higher CR rate (100% mutated vs. 39% wild-type; $p = 0.029$). After a median follow-up of 44 months, 3-year PFS was 56% (95% CI: 37–84%). No clinical variable predicted PFS, whereas the single mutation at *PTPRD* predicted for a longer PFS (2-year PFS 100% vs. 39% for mutated and wild-type *PTPRD*, respectively; $p = 0.035$). Overall, three patients died during follow-up, with a 3-year OS of 85% (95% CI: 63–99%). No clinical or genetic variables were able to predict OS.

4. Discussion

Analysis of cfDNA has been increasingly used for assessing molecular profiling at diagnosis, to define prognosis, and for identification of therapeutic targets in oncology, including patients with lymphoma [19]. Here, we have analyzed the applicability of cfDNA as a reliable source for mutational and CNA assessment of PMBL patients in whom diagnostic biopsies are often difficult to obtain. Indeed, the information about the utility of cfDNA in PMBL is scarce, with only one recently published report [20].

In the present series, we were able to detect mutations in the cfDNA in 18 out of 20 (90%) cases, a similar rate to that reported in other lymphoma series, including a DLBCL

cohort from our own institution [10,11]. Camus et al. [20] reported the mutational profile of 44 patients with PMBL using an abridged targeted panel of nine genes, detecting at least one mutation in 32 (73%) patients. The higher detection rate obtained in our study could be explained by the fact that we have used a broader gene panel including analysis of CNA and we have used molecular-barcode technology to improve background removal in the analysis of sequencing data and increase sensitivity. We also aimed to determine the reliability of the technique by comparing the mutational profile obtained from FFPE samples. In our hands, the sensitivity of cfDNA to detect mutations present in the paired FFPE samples was 69%. Once more, this is in line with previous publications on DLBCL by us and others [9–11].

Different genetic alterations have been described in PMBL, including constitutive activation of the NF- κ B and JAK-STAT pathways, along with genetic alterations that promote immune evasion [21]. The mutational landscape described from cfDNA in our study was highly consistent with that previously published in different series, including two integrative genetic analyses [3,22]. Thus, members of the JAK-STAT and NF- κ B pathways, including *SOCS1*, *STAT6*, *NFKBIA*, *NFKBIE*, and *TNFAIP3* were among the most frequently altered genes. Recurrent CNA have been described in PMBL including gains of 9p (*CD274* and *PDCD1LG2*), 2p (*REL*), chromosome 6, and 11q. Importantly, we were also able to detect CNA from cfDNA using low-pass WGS, with high accuracy for clonal CNA compared to matched FFPE tumoral tissue samples. The usefulness of cfDNA for CNA has been previously assessed on lymphoma. Rushton and colleagues [23] evaluated CNA from 45 relapsed/refractory DLBCL (rrDLBCL) derived liquid biopsies collected after relapse using low-pass WGS, identifying nine regions enriched for recurrent amplifications or deletions among rrDLBCL, providing insight into the biology of rrDLBCL from easily accessible sources such as the peripheral blood.

Due to the limited number of fully studied cases, it was difficult to find significant correlations with prognosis in the current study. In fact, even the main clinical variables did not show a predictive impact. Nevertheless, it is noteworthy that patients with *PTPRD* mutation had a higher CR rate and prolonged PFS. *PTPRD* encodes the receptor-type-protein-tyrosine-phosphatase- δ , a tumor suppressor gene involved in cell growth regulation through the JAK-STAT signal pathway. It has been previously described in indolent and aggressive lymphomas, including marginal zone lymphoma and the primary central nervous system DLBCL [24]. *PTPRD* mutations were associated with better PFS and OS in patients with non-small cell lung cancer treated with immune checkpoint blockade, providing evidence for exploring the role of this mutation in the PMBL patients who receive immune checkpoint blockade in the era of immunotherapy [25].

Besides the genetic characterization of the mutational profile and CNA, the quantification of cfDNA has been associated with well-recognized clinical parameters of tumor burden (LDH, beta-2-microglobulin, total metabolic tumor volume), CR rate, and survival in DLBCL and other lymphoid malignances, including a series from our institution [9,10,12]. However, in the present series, this correlation could not be established.

Tissue biopsies represent a bottleneck in the genetic characterization of the PMBL due to the location of the tumors. Surgical biopsy by cervical mediastinoscopy, anterior mediastinotomy, or thoracoscopy is preferred over core biopsy [26], and sometimes samples are scarce or exhausted during the diagnostic process, limiting further molecular studies [27]. Plasma is an accessible source of tumor DNA when DNA cannot be retrieved from the diagnostic biopsy tissue and, indeed, cfDNA might be useful not only at diagnosis (when tissue biopsy is mandatory), but also upon relapse, when excision biopsy is frequently unavailable. In this sense, our study supports the use of cfDNA for an accurate genetic characterization of PMBL tumors.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/diagnostics12071575/s1>. Supplementary methods; Table S1. Genes sequenced using target NGS; Table S2. All mutations (374) called in series of 18 PMBCL after exclusion of synonymous variants, intron variants and known polymorphisms. Table S3. CNA in PMBCL.

Author Contributions: A.R.-D., M.A.-C., B.B. and A.L.-G.: concept and design, data collection, data analysis/interpretation, manuscript drafting/revision; F.N.: bioinformatic analyses, data analysis/interpretation, manuscript drafting/revision; C.L. and A.E.: data interpretation and manuscript revision; G.F., E.C. and L.C.: histological review and manuscript review; P.M., E.G., B.S.-G., N.V., S.B. and A.S.: data collection, manuscript revision. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study has been funded by Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) through the projects PI16/00420 and PI19/00887 to A.L.-G. and E.G., PI17/00313 to L.C., PI19/0005 to B.B., and PI19/00034 to A.S., and co-funded by the European Union; CIBERONC [grant numbers CB16/12/00334, CB16/12/00225, and CB16/12/00241]; and the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme and the Canadian Institutes of Health Research [grant number 825835 to E.C.]. F.N. acknowledges the research support from the American Association for Cancer Research (2021 AACR-Amgen Fellowship in Clinical/Translational Cancer Research, Grant Number 21-40-11-NADE), the European Hematology Association (EHA Junior Research Grant 2021, Grant Number RG-202012-00245), and the Lady Tata Memorial Trust (International Award for Research in Leukaemia 2021–2022, Grant Number LADY_TATA_21_3223). C.L. is supported by postdoctoral Beatriz de Pinós from Secretaria d'Universitats i Recerca del Departament d'Empresa i Coneixement de la Generalitat de Catalunya and by Marie Skłodowska-Curie COFUND program from H2020 (2018-BP-00055). E.C. is an Academia Researcher of the "Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats" (ICREA) [no grant number applies] of the Generalitat de Catalunya. We also acknowledge the support of the CERCA Program from Generalitat de Catalunya [no grant number applies].

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and approved by the Institutional Review Board (Hospital Clínic de Barcelona, protocol code HCB/2016/0299, date of approval 26 June 2016).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The datasets analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Acknowledgments: We are indebted to the Genomics core facility of the Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS) for their technical help. We are grateful to M. Osuna, S. Martín, V. Arellano, and S. Ruiz for their support. This work was partially developed at the Centre Esther Koplowitz (CEK), Barcelona, Spain.

Conflicts of Interest: The authors declare no competing interest.

References

1. Swerdlow, S.H.; Campo, E.; Harris, N.L.; Jaffe, E.S.; Pileri, S.A.; Stein, H.; Thiele, J.; Vardiman, J.W. *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*, 4th ed.; International Agency for Research on Cancer (IARC): Lyon, France, 2017.
2. Sun, W.; Song, K.; Zervos, M.; Pass, H.; Cangiarella, J.; Bizakis, C.; Crawford, B.; Wang, B.Y. The diagnostic value of endobronchial ultrasound-guided needle biopsy in lung cancer and mediastinal adenopathy. *Diagn. Cytopathol.* **2010**, *38*, 337–342. [\[CrossRef\]](#)
3. Mottok, A.; Hung, S.S.; Chavez, E.A.; Woolcock, B.; Telenius, A.; Chong, L.C.; Meissner, B.; Nakamura, H.; Rushton, C.; Viganò, E.; et al. Integrative genomic analysis identifies key pathogenic mechanisms in primary mediastinal large B-cell lymphoma. *Blood* **2019**, *134*, 802–813. [\[CrossRef\]](#)
4. Lees, C.; Keane, C.; Gandhi, M.K.; Gunawardana, J. Biology and therapy of primary mediastinal B-cell lymphoma: Current status and future directions. *Br. J. Haematol.* **2019**, *185*, 25–41. [\[CrossRef\]](#)
5. Lv, L.; Liu, Y. Clinical Application of Liquid Biopsy in Non-Hodgkin Lymphoma. *Front. Oncol.* **2021**, *11*, 658234. [\[CrossRef\]](#)
6. Fernández-Lázaro, D.; Hernández, J.L.G.; García, A.C.; del Castillo, A.C.; Hueso, M.V.; Cruz-Hernández, J.J. Clinical Perspective and Translational Oncology of Liquid Biopsy. *Diagnostics* **2020**, *10*, 443. [\[CrossRef\]](#)
7. Lakhota, R.; Roschewski, M. Circulating tumour DNA in B-cell lymphomas: Current state and future prospects. *Br. J. Haematol.* **2021**, *193*, 867–881. [\[CrossRef\]](#)

8. Scherer, F.; Kurtz, D.M.; Newman, A.M.; Stehr, H.; Craig, A.F.M.; Esfahani, M.S.; Lovejoy, A.F.; Chabon, J.J.; Klass, D.M.; Liu, C.L.; et al. Distinct biological subtypes and patterns of genome evolution in lymphoma revealed by circulating tumor DNA. *Sci. Transl. Med.* **2016**, *8*, 364ra155. [\[CrossRef\]](#)
9. Bohers, E.; Viailly, P.-J.; Becker, S.; Marchand, V.; Ruminy, P.; Maingonnat, C.; Bertrand, P.; Etancelin, P.; Picquenot, J.-M.; Camus, V.; et al. Non-invasive monitoring of diffuse large B-cell lymphoma by cell-free DNA high-throughput targeted sequencing: Analysis of a prospective cohort. *Blood Cancer J.* **2018**, *8*, 74. [\[CrossRef\]](#)
10. Rivas-Delgado, A.; Nadeu, F.; Enjuanes, A.; Casanueva-Eliceiry, S.; Mozas, P.; Magnano, L.; de Anta, N.C.; Rovira, J.; Dlouhy, I.; Martín, S.; et al. Mutational Landscape and Tumor Burden Assessed by Cell-free DNA in Diffuse Large B-Cell Lymphoma in a Population-Based Study. *Clin. Cancer Res.* **2021**, *27*, 513–521. [\[CrossRef\]](#)
11. Rossi, D.; Diop, F.; Spaccarotella, E.; Monti, S.; Zanni, M.; Rasi, S.; Deambrogi, C.; Spina, V.; Bruscaggin, A.; Favini, C.; et al. Diffuse large B-cell lymphoma genotyping on the liquid biopsy. *Blood* **2017**, *129*, 1947–1957. [\[CrossRef\]](#)
12. Kurtz, D.M.; Scherer, F.; Jin, M.C.; Soo, J.; Craig, A.F.M.; Esfahani, M.S.; Chabon, J.J.; Stehr, H.; Liu, C.L.; Tibshirani, R.; et al. Circulating Tumor DNA Measurements As Early Outcome Predictors in Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *J. Clin. Oncol.* **2018**, *36*, 2845–2853. [\[CrossRef\]](#)
13. Cheson, B.D.; Fisher, R.I.; Barrington, S.F.; Cavalli, F.; Schwartz, L.H.; Zucca, E.; Lister, T.A. Recommendations for initial evaluation, staging, and response assessment of hodgkin and non-hodgkin lymphoma: The lugano classification. *J. Clin. Oncol.* **2014**, *32*, 3059–3067. [\[CrossRef\]](#)
14. Nadeu, F.; Delgado, J.; Royo, C.; Baumann, T.; Stankovic, T.; Pinyol, M.; Jares, P.; Navarro, A.; Martín-García, D.; Beà, S.; et al. Clinical impact of clonal and subclonal TP53, SF3B1, BIRC3, NOTCH1, and ATM mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **2016**, *127*, 2122–2130. [\[CrossRef\]](#)
15. Puente, X.S.; Beà, S.; Valdés-Mas, R.; Villamor, N.; Gutiérrez-Abril, J.; Martín-Subero, J.I.; Munar, M.; Rubio-Pérez, C.; Jares, P.; Aymerich, M.; et al. Non-coding recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature* **2015**, *526*, 519–524. [\[CrossRef\]](#)
16. Li, H.; Durbin, R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* **2009**, *25*, 1754–1760. [\[CrossRef\]](#)
17. Li, H.; Handsaker, B.; Wysoker, A.; Fennell, T.; Ruan, J.; Homer, N.; Marth, G.; Abecasis, G.; Durbin, R. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* **2009**, *25*, 2078–2079. [\[CrossRef\]](#)
18. Adalsteinsson, V.A.; Ha, G.; Freeman, S.S.; Choudhury, A.D.; Stover, D.G.; Parsons, H.A.; Gydush, G.; Reed, S.C.; Rotem, D.; Rhoades, J.; et al. Scalable whole-exome sequencing of cell-free DNA reveals high concordance with metastatic tumors. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 1324. [\[CrossRef\]](#)
19. Heitzer, E.; Haque, I.S.; Roberts, C.E.S.; Speicher, M.R. Current and future perspectives of liquid biopsies in genomics-driven oncology. *Nat. Rev. Genet.* **2019**, *20*, 71–88. [\[CrossRef\]](#)
20. Camus, V.; Viennot, M.; Lévêque, E.; Viailly, P.-J.; Tonnelet, D.; Veresezan, E.-L.; Drieux, F.; Etancelin, P.; Dubois, S.; Stamatoullas, A.; et al. Circulating tumor DNA in primary mediastinal large B-cell lymphoma versus classical Hodgkin lymphoma: A retrospective study. *Leuk. Lymphoma* **2022**, *63*, 834–844. [\[CrossRef\]](#)
21. Roschewski, M.; Phelan, J.D.; Wilson, W.H. Molecular Classification and Treatment of Diffuse Large B-Cell Lymphoma and Primary Mediastinal B-Cell Lymphoma. *Cancer J.* **2020**, *26*, 195–205. [\[CrossRef\]](#)
22. Chapuy, B.; Stewart, C.; Dunford, A.J.; Kim, J.; Wienand, K.; Kamburov, A.; Griffin, G.K.; Chen, P.-H.; Lako, A.; Redd, R.A.; et al. Genomic analyses of PMBL reveal new drivers and mechanisms of sensitivity to PD-1 blockade. *Blood* **2019**, *134*, 2369–2382. [\[CrossRef\]](#)
23. Rushton, C.K.; Arthur, S.E.; Alcaide, M.; Cheung, M.; Jiang, A.; Coyle, K.M.; Cleary, K.L.S.; Thomas, N.; Hilton, L.K.; Michaud, N.; et al. Genetic and evolutionary patterns of treatment resistance in relapsed B-cell lymphoma. *Blood Adv.* **2020**, *4*, 2886–2898. [\[CrossRef\]](#)
24. Spina, V.; Khiabani, H.; Messina, M.; Monti, S.; Cascione, L.; Bruscaggin, A.; Spaccarotella, E.; Holmes, A.B.; Arcaini, L.; Lucioni, M.; et al. The genetics of nodal marginal zone lymphoma. *Blood* **2016**, *128*, 1362–1373. [\[CrossRef\]](#)
25. Wang, X.; Wu, B.; Yan, Z.; Wang, G.; Chen, S.; Zeng, J.; Tao, F.; Xu, B.; Ke, H.; Li, M. Association of PTPRD/PTPRT Mutation with Better Clinical Outcomes in NSCLC Patients Treated with Immune Checkpoint Blockades. *Front. Oncol.* **2021**, *11*, 650122. [\[CrossRef\]](#)
26. Ondrejka, S.L.; Ott, G. How I Diagnose Primary Mediastinal (Thymic) Large B-Cell Lymphoma. *Am. J. Clin. Pathol.* **2021**, *156*, 497–512. [\[CrossRef\]](#)
27. Mottok, A.; Wright, G.; Rosenwald, A.; Ott, G.; Ramsower, C.; Campo, E.; Braziel, R.M.; Delabie, J.; Weisenburger, D.D.; Song, J.Y.; et al. Molecular classification of primary mediastinal large B-cell lymphoma using routinely available tissue specimens. *Blood* **2018**, *132*, 2401–2405. [\[CrossRef\]](#)

Cell-Free DNA for Genomic Analysis in Primary Mediastinal Large B-Cell

Lymphoma

Supplemental Materials

Supplementary Methods

1. Clinical and evolutionary characteristics
2. Sample processing and DNA extraction
3. Library design for hybrid selection
4. Next generation sequencing
5. Bioinformatic analyses
6. Somatic *versus* germ line variants classification

Clinical and evolutionary characteristics

The main clinico-biological and evolutionary characteristics were recorded and analyzed. These variables included: (a) clinical data: age, sex, performance status according to the Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) scale, presence of B symptoms and bulky disease (defined as a tumor diameter >7 cm), nodal and extranodal involvement, number of extranodal involved sites, palpable splenomegaly, bone marrow infiltration, and Ann Arbor Stage; (b) hematological and biochemical parameters: white blood cell and lymphocyte counts, hemoglobin, and serum lactate dehydrogenase (LDH); (c) the International Prognostic Index (IPI).

Sample processing and DNA extraction

Blood samples were centrifuged for 10 min at 1500g and subsequently for 1 minute at 20000 g. Plasma was aliquoted into 1mL in microtubes and stored at -80°C until extraction. cfDNA was extracted from 1-4 mL of plasma using the QIAamp circulating nucleic acid kit (Qiagen, Germany) or MagMAX Cell-Free DNA Isolation Kit (ThermoFisher Scientific, Foster City, USA). The quantity and quality of the samples were assessed using Qubit High Sensitivity dsDNA (Thermo Fisher Scientific) and TapeStation (Agilent). Genomic DNA and RNA were isolated from FFPE diagnostic tissue biopsies. Five 10 µm-thick sections per sample were used to extract RNA and DNA using the AllPrep DNA/RNA FFPE Kit (Qiagen, Germany) according to the manufacturer's instructions.

Library design for hybrid selection

A capture-based sequencing gene panel targeting 112 genes (target region: 388Kb) recurrently mutated in DLBCL and other mature B-cell tumors was specifically designed for this project (Supplementary Table S1). The design of the panel was carried out to interrogate: 1) genes mutated in >5% of mature B-cell tumors, 2) genes associated with resistance to chemotherapy in mature B-cell tumors.

Next generation sequencing

Mutation profiles were generated using a custom hybridization capture-based panel strategy (compatible with cfDNA and DNA from FFPE samples) and subsequent sequencing in a MiSeq instrument (Illumina). Libraries were performed using 15-30 ng of cfDNA and 150 ng of gDNA from FFPE samples, following the procedure indicated by the manufacturer recommendations. Targeted sequencing was performed using

molecular-barcoded library adapters (*ThruPLEX Tag-seq* kit, Takara) and a hybridization capture based method (SureSelectXT-Agilent Technologies), following the manufacturer's recommendations. Quality of the libraries was determined using the Bioanalyzer high sensitivity DNA kit (Agilent) and quantified by PCR using the KAPA library quantification kit (KAPA Biosystems). Finally, the libraries were pooled and sequenced at 2x150 bp in a MiSeq instrument.

Bioinformatic analyses

Capture-based next-generation sequencing data was analyzed for gene mutations using an updated version of our in-house pipeline¹. Briefly, raw reads were trimmed using the SurecallTrimmer (v4.0.1, AGeNT, Agilent). Alignment of the trimmed reads was performed using BWA-mem algorithm (v0.7.17), PCR or optical duplicates were marked using MarkDuplicates from Picard (RRID: SCR_006525), and the base quality score recalibration was performed using GATK's BaseRecalibrator and ApplyBQSR functions (RRID: SCR_001876 v4.0). Coverage uniformity and quality control metrics were extracted using Picard (CollectInsertSizeMetrics, EstimateLibraryComplexity, CollectAlignmentSummaryMetrics, CollectTargetedPcrMetrics, and CollectSequencingArtifactMetrics) and samtools (idxstats, and flagstat). As previously observed², all interrogated regions showed sufficient sequencing quality and coverage. Variant calling was performed in parallel using VarScan2 (v2.4.3), Mutect2 (GATK v4.0.4.0), VarDict (v1.4), outLyzer (v1.0), and freebayes (v1.1.0-54-g49413aa). Only variants that were identified as "PASS" by at least 3 of the algorithms were considered. Finally, variants were annotated using snpEff/snpSift (v4.3t). Mutations were visually

inspected on Integrative Genomics Viewer (IGV). All programs were executed using default settings.

Somatic *versus* germ line variants classification

Variants reported in 1000 Genome Project, ExAC and/or gnomAD with a population frequency >1% were considered polymorphisms and automatically removed from the analysis. To further filter out non-recurrent polymorphisms, variants were only considered somatic if 1) they were not reported as germ line in our custom ICGC data base of 506 WGS/WES³; and were 2) truncating, or 3) predicted as potentially damaging by at least one of the following algorithms: CADD (phred score > 10), PolyPhen2 (score> 0.9), SIFT (score < 0.1) (RRID: SCR_012813), and/or MutationAssessor (score > 2) (RRID: SCR_005762).

REFERENECS

1. Nadeu F, Delgado J, Royo C, et al. Clinical impact of clonal and subclonal TP53, SF3B1, BIRC3, NOTCH1, and ATM mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2016; 127(17): 2122–2130.
2. Rivas-Delgado A, Nadeu F, Enjuanes A, et al. Mutational Landscape and Tumor Burden Assessed by Cell-free DNA in Diffuse Large B-Cell Lymphoma in a Population-Based Study. *Clinical Cancer Research*. 2021 27(2): 513–521.
3. Puente XS, Beà S, Valdés-Mas R, et al. Non-coding recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature*. 526, 519–524 (2015).

TERCER TRABAJO

TESTICULAR LARGE B-CELL LYMPHOMA IS GENETICALLY SIMILAR TO PRIMARY CENTRAL NERVOUS SYSTEM LYMPHOMA AND DISTINCT FROM NODAL DIFFUSE LARGE B-CELL LYMPHOMA

Alfredo Rivas-Delgado, Cristina López, Guillem Clot, Ferran Nadeu, Marta Grau, Gerard Frigola, Jan Bosch, Josefine Radke, Naveed Ishaque, Miguel Alcoceba, Gustavo Tapia Melendo, Luis Luizaga, Carmen Barcena, Nicholas Kelleher, Neus Villamor, Tycho Baumann, Ana Muntanola, Juan Manuel Sancho-Cia, Alejandro Martin García-Sancho, Eva Gonzalez Barca, Estella Matutes, Ken Karube, Itziar Salaverria, Anna Enjuanes, Frank L Heppner, Reiner Siebert, Fina Climent, Elías Campo, Eva Giné, Armando López-Guillermo, Silvia Beà.

Enviado para publicación

RESUMEN TERCER TRABAJO

El linfoma testicular de células B grandes (TLBCL) es un linfoma agresivo y poco frecuente que se presenta en un sitio inmunoprivilegiado, recientemente reconocido como una entidad distinta del linfoma difuso de células B grandes (DLBCL). El objetivo de este estudio fue la caracterización genética de TLBCL, así como la posterior comparación con dos series previamente publicadas, una de LDCGB nodal y otra de linfoma difuso de células de células grande B primario del sistema nervioso central (PCNSL).

Se incluyeron 61 pacientes diagnosticados de TLBCL en seis centros españoles entre 2002 y 2021. La determinación de la célula de origen se evaluó mediante inmunohistoquímica (algoritmo de Hans) y/o *arrays* de expresión (Lymph2Cx). Para caracterizar las alteraciones genéticas del TLBCL, realizamos NGS utilizando un panel diseñado de 115 genes, *arrays* de expresión para determinar las alteraciones del número de copias y estudios de FISH (*BCL2*, *BCL6* y *MYC*). La mediana de edad fue de 70 años y el 30% de los pacientes presentaban enfermedad diseminada (estadio IV) al diagnóstico, incluidos 6 casos con afectación del SNC. El 83% de los casos presentó un fenotipo no GCB por el algoritmo de Hans y el 71% correspondieron al subtipo ABC por Lymph2Cx. Se observó una alta prevalencia de pérdida de expresión de HLA clase I (91%) y HLA clase II (62%). Se detectaron reordenamientos de *BCL6* en el 36% (17/47) de los casos, sin reordenamientos concomitantes de *BCL2* y *MYC*. Integrando los resultados de las mutaciones y CNA los genes/regiones alteradas en >50% de los casos fueron *PRDM1*, *CDKN2A/B*, *TNFAIP3*, *SGK1*, *ARID1B*, *MYD88^{L265P}*, *SPIB*, *PIM1* y *CD79B*. Se detectaron alteraciones concomitantes en *MYD88^{L265P}*, *CD79B* y *PIM1* en 12 (29%) casos. Utilizando la herramienta LymphGen, el 71% (30/42) de los casos se pudo clasificar en un subgrupo molecular, siendo MCD el grupo más frecuente (66%, 20/30).

Comparamos los pacientes con enfermedad localizada frente a los pacientes con enfermedad sistémica (estadio IV). Como era de esperar, estos últimos presentaron más frecuentemente síntomas B, niveles séricos elevados de LDH, una puntuación IPI más alta y un peor ECOG. No se observaron diferencias en el subtipo de COO, los subgrupos LymphGen o los reordenamientos *MYC*, *BCL2*

y *BCL6*. Los pacientes con enfermedad localizada o diseminada mostraron una complejidad genómica similar según la cantidad de CNA y la cantidad de genes mutados.

En comparación con el LDCGB nodal, los pacientes con TLBCL, tanto localizado como diseminado, presentaron menos complejidad en el número de CNA ($P=0.01$ y $P < 0.04$, respectivamente) pero mostraron una mayor cantidad de mutaciones ($P=0.01$ y $P < 0.001$, respectivamente). El TLBCL presentó con mayor frecuencia ganancias de 18q21.32-q23 (*BCL2*) y deleciones 6q y 9p21.3 (*CDKN2A/B*). Las mutaciones de *PIM1*, *MYD88*^{L265P}, *CD79B*, *TBL1XR1*, *MEF2B*, *CIITA*, *EP300* y *ETV6* se encontraron enriquecidos en el TLBCL, mientras que las mutaciones de *BCL10* en el LDCGB nodal. No se hallaron diferencias genéticas entre TLBCL y PCNSL.

En conclusión, el TLBCL tiene un perfil genético distintivo similar al del PCNSL, lo que respalda su reconocimiento como una entidad separada del LDCGB y proporciona información decisiva para adaptar los enfoques terapéuticos.

ORIGINAL ARTICLE

TESTICULAR LARGE B-CELL LYMPHOMA IS GENETICALLY SIMILAR TO PRIMARY LARGE B-CELL LYMPHOMA OF THE CNS AND DISTINCT FROM NODAL DIFFUSE LARGE B-CELL LYMPHOMA

A Rivas-Delgado^{1,2,3*}, C. López^{2,4*}, G. Clot^{2,4}, F. Nadeu^{2,4}, M. Grau^{2,4}, G. Frigola⁵, J. Bosch-Schips⁶, J. Radke^{7,8,9}, N. Ishaque¹⁰, M. Alcoceba^{3,4,11,12}, G. Tapia Melendo^{13,14}, L. Luizaga¹⁵, C. Barcena¹⁶, N. Kelleher^{3,17}, N. Villamor^{2,4,5}, T. Baumann^{3,16}, A. Muntañola^{3,15}, J.M. Sancho-Cia^{3,13}, A. Martín García-Sancho^{3,4,11,12}, E. Gonzalez Barca^{3,18,19}, E. Matutes⁵, K. Karube²⁰, I. Salaverria^{2,4}, A. Enjuanes^{2,4}, S. Wiemann^{8,21}, F.L. Heppner^{7,8}, R. Siebert²², F. Climent^{3,6}, E. Campo^{2,4,5,19}, E. Giné^{1,2,3,4}, A. López-Guillermo^{1,2,3,4,19*}, S. Beà^{2,3,4,5,19*}

1. Department of Hematology, Hospital Clínic, Barcelona, Spain
2. Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain
3. Grupo Español de Linfomas y Trasplante de Médula Ósea (GELTAMO), Madrid, Spain
4. Centro de Investigación Biomédica en Red de Cáncer (CIBERONC), Madrid, Spain
5. Hematopathology Section, Department of Pathology, Hospital Clínic, Barcelona, Spain
6. Department of Pathology, Hospital Universitari de Bellvitge, IDIBELL, Hospitalet de Llobregat, Spain
7. Department of Neuropathology, Charité-Universitätsmedizin Berlin, corporate member of Freie Universität Berlin, Humboldt-Universität zu Berlin, Berlin Institute of Health, Berlin, Germany
8. German Cancer Consortium (DKTK), Partner Site Charité Berlin, Berlin, Germany
9. Institute of Pathology, Universitätsmedizin Greifswald, Greifswald, Germany
10. Berlin Institute of Health at Charité – Universitätsmedizin Berlin, Center for Digital Health, Berlin, Germany.
11. Department of Hematology, Hospital Universitario de Salamanca, IBSAL, Salamanca, Spain
12. Centro de Investigación del Cáncer-IBMCC (USAL-CSIC), Salamanca, Spain
13. Departments of Hematology and Pathology, Institut Català d'Oncologia, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain
14. Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain
15. Departments of Hematology and Pathology, Hospital Universitari Mutua de Terrassa, Terrassa, Spain
16. Departments of Hematology and Pathology, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain
17. Department of Hematology, Institut Català d'Oncologia-Hospital Universitari de Girona Doctor Josep Trueta, Girona, Spain
18. Department of Hematology, Institut Català d'Oncologia-Hospital Duran i Reynals, Hospitalet de Llobregat, IDIBELL, Spain
19. Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain
20. Department of Pathology and Laboratory Medicine, Nagoya University Hospital, Nagoya, Japan.
21. Division of Molecular Genome Analysis, German Cancer Research Center (DKFZ), Heidelberg, Germany
22. Institute of Human Genetics, Ulm University & Ulm University Medical Center, Ulm, Germany

*Contributed equally as co-first and co-seniors authors of this article.

Corresponding author

Dr. Cristina López, PhD

Molecular pathology of lymphoid neoplasms

Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS)

Carrer Roselló 149-153, Barcelona, 08036, Spain

+34 932275400 ext. 4583

clopez2@recerca.clinic.cat

ABSTRACT

Background: Testicular large B-cell lymphoma (TLBCL) is an infrequent and aggressive lymphoma arising in an immune-privileged site and has recently been recognized as a distinct entity from diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL). We describe the genetic features of TLBCL and compare them with published series of nodal DLBCL and primary large B-cell lymphomas of the CNS (PCNSL).

Patients and methods: We collected 61 patients with TLBCL. Cell-of-origin was determined by immunohistochemistry and Lymph2Cx assay. To characterize the genomic profile of TLBCL, we performed targeted next-generation sequencing, copy number arrays, and fluorescent *in situ* hybridization to assess chromosomal rearrangements.

Results: Seventy percent of the cases showed localized stages (I/II) and 83% a non-germinal center phenotype by Hans' algorithm. *BCL6* rearrangements were detected in 36% of cases, and no concomitant *BCL2* and *MYC* rearrangements were found. Integrative analysis of mutational and copy number alterations (CNA) profiles in 40 cases showed that the most frequent alteration (>50%) in TLBCL were *PRDM1*, *CDKN2A/B*, *TNFAIP3*, *SGK1*, *ARID1B*, *MYD88*^{L265P}, *SPIB*, *PIM1*, and *CD79B*. Interestingly, patients with localized or disseminated disease displayed similar genomic profiles based on the number of CNAs and mutations. Using the LymphGen tool 71% (N=30/42) of the cases could be classified into an established molecular subgroup, with MCD being the most frequent (N=20). Compared with nodal DLBCL, TLBCL had less CNA complexity ($P<0.04$) but showed a higher number of somatic variants ($P<0.02$) and had more frequently 18q21.32-q23 (*BCL2*) gains, and 6q and 9p21.3 (*CDKN2A/B*) deletions. *PIM1*, *MYD88*^{L265P}, *CD79B*, *TBL1XR1*, *MEF2B*, *CIITA*, *EP300*, and *ETV6* mutations were enriched in TLBCL, and *BCL10* mutations in nodal DLBCL. There were no major genetic differences between TLBCL and PCNSL.

Conclusions: TLBCL has a distinctive genetic profile similar to PCNSL, supporting its recognition as a separate entity from DLBCL and might provide information to devise targeted therapeutic approaches.

Keywords: Testicular large B-cell lymphoma; Primary large B-cell lymphoma of the CNS; mutational profile; copy number alterations.

HIGHLIGHTS

- The majority of TLBCL cases exhibit a non-germinal center B-cell phenotype and cluster within MCD/C5 subgroup.
- The genetic profile of TLBCL involves alterations in genes related to BCR activation, TLR signaling, NF- κ B pathway, genomic instability, and immune evasion.
- TLBCL's genomic instability is linked to *CDKN2A/B*, particularly homozygous deletions, unlike nodal DLBCL, characterized by *TP53*, *RB1*, or *MYC* alterations.
- TLBCL has a distinct genetic profile that resembles PCNSL, further supporting its recognition as a separate entity from DLBCL.

INTRODUCTION

Testicular lymphoma is a rare and aggressive lymphoma accounting for 1-2% of all non-Hodgkin's lymphomas (NHL) and 4% of extranodal lymphomas^{1,2}. Approximately 80-90% of testicular lymphomas correspond to diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL)³. The 5th edition of the World Health Organization (WHO) classification defines a new entity, "Primary large B-cell lymphoma of immune-privileged sites," encompassing primary large B-cell lymphoma of the CNS, vitreoretinal compartment, and testes⁴. The International Consensus Classification of Mature Lymphoid Neoplasms recognizes primary DLBCL of the testis as a separate entity, but it remains uncertain whether extranodal lymphomas arising in immune-privileged sites should be grouped as a unique entity⁵. The majority of testicular large B-cell lymphoma (TLBCL) patients present with localized stages (stage I-II), although 20-30% of the cases may exhibit disseminated disease⁶. TLBCL has marked extranodal tropism, being the central nervous system (CNS) and contralateral testis the most common sites of dissemination^{7,8}. Although the outcome of TLBCL patients substantially improved after the introduction of rituximab, they still show frequent relapses or treatment failure and, therefore, a poor prognosis^{8,9}.

Around 70-90% of TLBCLs resemble the activated B-cell (ABC) or non-germinal center subtype of nodal DLBCL¹⁰⁻¹², and the majority of cases cluster among the recently described molecular subgroups MCD/C5, with frequent genetic alterations of NF- κ B, Toll-like receptor (TLR), and B-cell receptor (BCR) signaling pathways, including somatic mutations of *MYD88*^{L265P}, *CARD11*, and *CD79B*¹³⁻¹⁵. TLBCL develops in an immune-privileged site behind the blood-testis barrier and shares some genetic alterations with Primary large B-cell lymphomas of the CNS (PCNSL), including the mutations described above, *CDKN2A* (9p21) mutation/loss, structural rearrangements in the *PD-1/PD-2* loci (9p24), and frequent loss of HLA class I and II expression or loss of HLA loci (6p21), leading to immune evasion^{16,17}.

The genetic alterations in TLBCL, including the similarities with PCNSL and differences from nodal DLBCL, have not been fully characterized. Herein, we investigated the genomic profile of TLBCL, looking at the clinical impact of the genetic lesions in the immunotherapy era, and compared the results with previously published series of PCNSL and nodal DLBCL.

METHODS

Patients and samples

We included 61 patients diagnosed with TLBCL according to the updated 4th edition of the WHO¹⁸ classification between 2005 and 2021 in seven institutions from the Spanish group of lymphomas (GELTAMO). The staging was performed according to standard procedures, including PET/CT, unilateral bone marrow biopsy, and lumbar puncture for cerebrospinal fluid analysis by cytology and flow cytometry¹⁹. We considered localized disease in those cases in Stage I or Stage II with only locoregional lymph nodes involved; all the remaining cases were considered as disseminated. Patients provided written informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki, and the study was approved by the Institution's Review Board (HCB/2020/0787). The main clinical-biological features, response to therapy, and outcome were recorded and analyzed. All but five patients were treated with chemoimmunotherapy, followed by radiotherapy to the contralateral testis in 62% of the patients (Table 1). Responses were assessed by end-of-therapy PET/CT according to standard guidelines²⁰.

Two independent series were used to compare the genetic features of TLBCL: i) 112 patients with nodal DLBCL from our institution²¹ and, ii) 39 PCNSL patients previously published²².

Histological review

Histological diagnosis, including morphology and immunohistochemistry, was reviewed by expert pathologists. *MYC*, *BCL2*, *BCL6*, *JAK2*, and *IRF4* rearrangements were assessed by Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) using break-apart and/or dual-color dual-fusion commercial probes (Metasystems, Altlußheim, Germany) (Supplementary Materials and Methods). HLA class I (HLA-A) and II (HLA-DR) expression were determined by immunohistochemistry (Supplementary Table 1 and Supplementary Materials and Methods). Cell-of-origin (COO) assessment was performed by immunohistochemistry (IHC) according to the Hans' algorithm and, in the cases with available RNA, through the Lymph2Cx Assay (NanoString Technologies) (Supplementary Materials and Methods).

CNA and targeted NGS analysis

DNA and RNA were isolated from 42 formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) and one fresh frozen tissue from diagnostic samples using the AllPrep DNA/RNA FFPE Kit (Qiagen, Germany) and QIAmp DNA/RNA Mini Kit (Qiagen, Germany), respectively.

CNA were analyzed in 42 samples using the Oncoscan CNV FFPE assay and in 1 sample using CytoScan® HD assay (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) (Supplementary Table 2). Nexus version 9.0 Discovery Edition software (Biodiscovery, El Segundo, CA) was used to analyze and visualize results. The human reference genome used was GRCh37/hg19. Driver CNAs were determined by the GISTIC algorithm (2.0.23)²³.

Single nucleotide variants (SNVs) and short insertions /deletions (indels) were evaluated in 42 samples using a B-cell malignancy-oriented targeted panel covering 115 genes (SureSelectXT, Agilent Technologies) (Supplementary Table 3 and Supplementary methods) and sequenced in a MiSeq instrument (Illumina). The bioinformatic analysis was performed using an updated version of our in-house pipeline^{24,25} (Supplementary Methods). The LymphGen 2.0 probabilistic classification tool was used to classify TLBCL cases into the recently described genetic subtypes¹³.

Statistical analysis

Fisher's exact test was used to evaluate the association between categorical variables. Negative binomial generalized linear models, implemented in the *glm.nb* function of the MASS R package, were used to evaluate the associations between the accumulation of alterations and the lymphoma entities, adjusting for the COO. An exact conditional test implemented in the *mantelhaen.test* R function was used to evaluate the association between the presence of an alteration and the lymphoma entity, adjusting for the COO. The endpoints were progression-free survival (PFS) and overall survival (OS). The log-rank test or Cox regression were used to evaluate the association between the endpoints and categorical or quantitative variables, respectively. Cox regression was also used to estimate the hazard ratios (HR). *P*-values were adjusted using the Benjamini-Hochberg method. To reduce the potential bias created by the detection sensibility of mutations and CNAs by the different technologies used in the TLBCL and PCNSL series, when comparing those series, TLBCL mutations with VAF<10% and PCNSL CNA segments smaller than 100kb were filtered out.

RESULTS

Baseline features

The main clinical-biological characteristics of the patients are listed in Table 1. The median age was 70 years and 30% of the patients had disseminated disease at diagnosis, including 6 cases with CNS involvement. A high prevalence of loss of HLA class I (37/41, 91%) and HLA class II (28/43, 62%) expression was observed (Supplementary Figure 1). To determine the COO by Hans' algorithm, immunohistochemical evaluation of CD10, BCL6, and MUM1 was available in 53 cases, of which 44 (83%) were categorized as non-GCB subtype, and 9 were classified as GCB subtype. Among the nine GCB cases, eight of them had an ambiguous phenotype with co-expression of CD10 and MUM1. Lymph2Cx assay classified 42 cases into three categories: 71% ABC, 17% GCB, and 12% unclassified. The concordance rate between the Lymph2Cx assay and Hans' algorithm was 76% (Supplementary Figure 2). Three of the eight patients with ambiguous immunophenotypes by Hans' algorithm were classified as ABC and one remained unclassified by Lymph2Cx. Of note, in any of these cases, neither plasmablastic morphology nor *IRF4* rearrangement (available in 4 out of 8) was observed (Supplementary Table 2). On the other hand, *MYC*, *BCL2*, and *BCL6* rearrangements were found in 8%, 4%, and 36% of cases, respectively. Two cases showed simultaneous *MYC* and *BCL6* rearrangement, whilst no concomitant *BCL2* and *MYC* rearrangement were detected. Double-expressor phenotype was observed in 39% of cases (N=11/28).

Copy number profiling

To determine the recurrent chromosomal abnormalities, including copy number alterations (CNA) and copy number neutral loss of heterozygosity (CN-LOH), we performed SNP-arrays on 43 cases. Our analysis revealed a median of 13 CNAs per case (range 1-43), comprising 6 gains (range 0-24), 6 losses (range 0-28), and 2 CN-LOH per case (range 0-10) (Supplementary Table 4). The most frequently observed CNA regions (>10%) were: i) gains 19q13 (*SPIB*), 1q, 18q21-q22 (*BCL2*), 6p25-p22, 9p13 (*ZCCHC7*), 4q, 11q24-q25 (*ETS1*, *FLI1*), 9p24 (*JAK2*), and 17q12-q21; ii) trisomies 18, 3, 7, 12, and 21; and iii) losses of 9p21 (*CDKN2A/B*), 6q21 (*PRDM1*), 6q23-q24 (*TNFAIP3*), 1q32-q44, 15q15 (*B2M*), 17p13 (*TP53*), 6p21 (*HLA-C*, *HLA-B*), 1p35, 14q32 (*BCL11B*, *EVL*), and 1p36, and CN-LOH 9p, 6p25-p23, 3p, and 3q (Figure 1). We also observed homozygous deletions at 9p21 (*CDKN2A/B*) and high copy gains at 18q21.31-q23 (*BCL2*) in 51% (22/43) and 9% (4/43) of the cases, respectively.

Using GISTIC, we identified five driver CNA (q-value<0.05): losses of 1p35, 6p21 (*HLA-C*, *HLA-B*), 6q21 (*PRDM1*), 9p21 (*CDKN2A/B*), and 1q gains (Supplementary Table 5). The 9p24.1 genomic region has been previously described as frequently altered in TLBCL¹⁶, we identified seven cases (16%) with genomic alterations in this region, including four gains detected by arrays and two gains and one break detected by FISH using a *JAK2* probe. Chromothripsis was observed in 12 (28%) cases, involving frequently (≥ 2 cases) chromosomes 1, 6, and 7 (Supplementary Figure 3). Notably, 58% (7/12) of these cases harbored genomic alterations (mutations or deletions) in *TP53*, *ATM*, or *SETD2* loci, previously associated with genomic instability and chromothripsis^{26–29}.

Genomic alterations and integrative analysis

A 115-gene custom-targeted sequencing panel was used to analyze 42 samples. The mean coverage of the samples was 599x (range 32-2001) (Supplementary Table 6). The median number of mutations per sample was 14 (range 1-132) (Supplementary Table 7). Integrating CNA, SNV, and indels in the 40 cases with NGS and CNA available, the genes/regions altered in >40% of the cases were *PRDM1* (68%), *CDKN2A/B* (68%), *TNFAIP3* (65%), *SGK1* (62%), *ARID1B* (60%), *MYD88*^{L265P} (57%), *SPIB* (55%), *PIM1* (55%), *CD79B* (50%), *KMT2D* (48%), *SETD1B* (48%), *OSBPL10* (42%), and gain of 19q13 (52%) and 1q (48%) (Figure 2). Concomitant mutations in *MYD88*^{L265P}, *CD79B*, and *PIM1* were detected in twelve (29%) cases (note that case TLBCL3 only had NGS data available). Seventy-one percent of the cases (30/42) could be classified into a molecular subgroup according to the LymphGen tool, the distribution was as follows: MCD, 20 cases (66%); BN2, 7 cases (24%), EZB, 2 cases (7%); composite (EZB/MCD/ST2), 1 case (3%) (Figure 2). Although MCD was the most prevalent group, most of the cases classified in the BN2 group harbor *BCL6* rearrangement (5/6, 83%, 9/34, 26%, $P=0.014$).

Localized vs. disseminated disease

We compared patients with localized (stages I and II, N=43) versus patients with disseminated disease (stage IV, N=18) since some of the latter might not correspond to primary TLBCL. As expected, patients with systemic disease significantly showed more frequent B symptoms, poorer performance status (ECOG index), higher LDH levels, and higher International Prognostic Index (IPI) scores. No major differences were observed in the COO subtype, LymphGen subgroups, and *MYC*, *BCL2*, or *BCL6* rearrangements (Supplementary Table 8 and Figure 2). Interestingly, patients with localized or disseminated disease displayed similar genomic complexity based on the

number of CNAs and mutated genes (Supplementary Figure 4). For this reason and to increase the statistical power both clinical groups were considered together and compared with nodal DLBCL and PCNSL series.

TLBCL and PCNSL share genetic alterations that differ from nodal DLBCL

We compared the CNAs and the mutational profile of TLBCL with previously published series of DLBCL²¹ (NGS panel and CNA) and PCNSL²² (whole-genome sequencing). For the comparative analyses, only the overlapping genes from both NGS panel designs were considered (N=60). PCNSL copy number profiles were assessed by ACE-seq, and the mutational analysis was made only considering the regions from the 115 genes present in the TLBCL panel. Due to the differences between the methodologies employed for the PCNSL and TLBCL sequencing analyses, only mutations in the TLBCL series with a variant allele frequency (VAF) greater than 10% were considered. To account for the different ABC/GCB frequencies between the three entities, all comparisons were adjusted for the COO (cases without COO information were excluded).

Compared with nodal DLBCL, localized and disseminated TLBCL have less CNA complexity ($P=0.008$ and $P=0.039$, respectively) but showed a higher number of mutations ($P=0.011$ and $P<0.001$, respectively) and a higher number of mutated genes ($P=0.027$ and $P<0.001$, respectively) (Supplementary Figure 4). TLBCL presented more frequently 18q21.32-q23 (*BCL2*) gains, and 6q and 9p21.3 (*CDKN2A/B*) deletions (Figure 3 and Supplementary Table 9). In contrast, 2p16.2-p13.3 (*REL* and *BCL11A*) and 8q22.3-q24.3 (*MYC*) gains, trisomy 5, and 1p and 13q14 deletions were more frequently observed in nodal DLBCL. Furthermore, *PIM1*, *MYD88*^{L265P}, *CD79B*, *TBL1XR1*, *MEF2B*, *CIITA*, *EP300*, and *ETV6* mutations were enriched in TLBCL, and *BCL10* mutations in nodal DLBCL (Figure 3B and Supplementary Table 10). Importantly, biallelic inactivation of *CDKN2A/B* and *PRDM1* was more prevalent in TLBCL compared to nodal DLBCL (Supplementary Table 11).

No clear differences in the number of mutations or the number of mutated genes were observed between TLBCL and PCNSL (Supplementary Figure 5). The CN complexity was not assessed considering the different resolutions of the applied technologies. 6p21.32 (*HLA-DRA*) deletion was the only alteration more prevalent in PCNSL, and no significant differences in specific genes between both groups were observed (Figure 3 and Supplementary Table 12-13).

We also performed the comparative analysis considering only localized TLBCL cases with similar findings, with main driver genes as *PIM1*, *MYD88*^{L265P}, *CD79B*, *ETV6*, and *TBL1XR1* being enriched in TLBCL (Supplementary Figure 6). In addition, we also

identified enrichment of *BTG1* mutations in localized TLBCL compared to nodal DLBCL, not detected in the above comparison between TLBCL (localized /disseminated) vs nodal DLBCL. Regarding the CN profile, no clear differences were observed between the groups, which could be explained by the loss of statistical power when using fewer cases for comparisons. When comparing localized TLBCL versus PCNSL, 6p21.32 deletions remained more frequent in PCNSL (10% vs 46%, adj. $P=0.19$) (data not shown).

Finally, despite adjusting for the COO to account for the varying frequencies of ABC/GCB between the three entities, we exclusively compared ABC TLBCL to ABC DLBCL founding a lower number of CNA and a higher number of mutated genes and mutations in ABC TLBCL versus ABC DLBCL ($P=0.015$, $P=0.032$, $P=0.01$, respectively) (Supplementary Figure 4). Furthermore, *PIM1*, *MYD88*^{L265P}, *CD79B*, *BTG1*, *TBL1XR1*, and *ETV6* mutations were more prevalent in ABC TLBCL (Supplementary Figure 7). Even when comparing only localized ABC TLBCL versus ABC DLBCL, *PIM1*, *MYD88*^{L265P}, *CD79B*, *BTG1*, and *ETV6* alterations were more frequent in localized ABC TLBCL. We observed no clear differences in the CN profile between the groups, ABC TLBCL vs ABC DLBCL or localized ABC TLBCL vs ABC DLBCL. However, due to the low number of TLBCL-GCB cases ($n=5$), we could not compare GCB TLBCL with GCB DLBCL. Nonetheless, the genomic profile of these cases was displayed in Supplementary Figure 8. Overall, regardless of the COO subtype, TLBCL localized or disseminated were enriched in *PIM1*, *MYD88*^{L265P}, *CD79B*, and *ETV6* alterations as compared to nodal DLBCL or only ABC DLBCL (Supplementary Figure 9).

Conversely, TLBCL displayed a similar genomic profile to PCNSL, with the exception of 6p21.3 (HLA-DR) deletions, which were enriched in PCNSL.

Clinical impact of initial variables and genetic lesions

After frontline treatment, 45 (80%) patients achieved complete response (CR), 1 (2%) had a partial response, and 10 (18%) were refractory, including six early deaths. Among CR patients, 13/45 (29%) eventually relapsed at a median of 26 months from achieving CR (range 3 to 93 months). PFS and OS at 5 years were 49% (95% confidence interval [CI]: 36-65) and 51% (95% CI: 40-69), respectively. With a median follow-up of 7 years, 29 patients (48%) had died: 13 patients due to progression, including two patients that received palliative care, and 16 due to causes other than TLBCL, including second neoplasms ($N=4$), infection, and treatment-related toxicity ($N=5$) and other ($N=7$). Patients with evidence of CNS at diagnosis had a shorter PFS (HR 3.28, CI95%: 1.1-9.8; $P=0.02$). Clinical variables associated with a shorter OS in

the univariate analysis were high β 2-microglobulin (*HR* 2.99, CI95%: 1.1-8.2; *P*=0.02). and CNS involvement (*HR* 3.32, CI95%: 1.1-9.7; *P*=0.03) (Supplementary Table 14). The only two mutations associated with poor PFS were *ATM* (*HR* 4.1, CI95%: 1.5-11.1; adjusted *P*=0.161) and *SPEN* (*HR* 3.8, CI95%: 1.3-10.8; adjusted *P*=0.209) (Supplementary Table 15).

DISCUSSION

In the present study, we analyzed the clinical and biological features of 61 cases of TLBCL treated in the rituximab era and compared the genetic profile with that previously published in nodal DLBCL and PCNSL series^{21,22}. In our cohort, 30% of the patients presented with disseminated disease at diagnosis, in line with previous studies^{6,9}. Although distinguishing stage III/IV TLBCL from systemic DLBCL with secondary testicular involvement is difficult and somewhat arbitrary, we did not find major differences in CNAs or mutational profiles between the two situations. In a recent study by Wong et al.³⁰, few genetic differences were observed between isolated TLBCL confined to the testes and those with advanced-stage disease. They observed *CD58* truncating mutations more frequently in stages II-IV (31%; $q < 0.1$), while *BTG2* mutations were more commonly detected in stage I disease (37% vs. 8%; $q < 0.1$). Similarly, our analysis revealed an enrichment of *BTG1* mutations in localized TLBCL compared to nodal DLBCL.

We confirmed that most TLBCL have a non-GC phenotype, with only 17% classified as GCB phenotype by IHC and Lymph2Cx. This supports the rarity of TLBCL cases with a GCB subtype, as previously reported, with the ABC/non-GCB phenotype representing 69 to 96% of cases^{1,10–12}. Of note, eight of the nine GCB subtype cases by Hans' algorithm had an ambiguous immunophenotype, co-expressing CD10 and MUM1, and 4 of these cases were reclassified as ABC (3) or unclassified (1) by Lymph2Cx. Our findings agree with those of Booman et al.¹², who reported that 8 out of 22 cases (36%) were classified as ambiguous by IHC and were mainly reclassified as ABC subtype (7/8) using gene expression analysis.

Using a comprehensive genomic analysis, we identified that TLBCL is characterized by alterations in genes involved in BCR activation (*CD79B*, *SGK1*), TLR signaling (*MYD88*), NF- κ B (*PIM1*, *TNFAIP3*) pathway, genomic instability or cell cycle control (*CDKN2A/B*), immune evasion (*HLA-C* and *HLA-B*), B cell differentiation (*PRDM1*), and epigenetic modulators (*ARID1B*). In the recent proposed molecular classification for DLBCL, most TLBCLs cluster within the MCD/C5/MYD88 group^{13,14,31}, enriched for *MYD88* and *CD79B* mutations. Using the LymphGen algorithm, the MCD group was the most frequent in our series, accounting for 66% of the cases. Alterations in *MYD88*^{L265P} and *CD79B* are a hallmark of extranodal^{15,16}. Several studies reported the high prevalence of these mutations in PCNSL, breast, and intravascular DLBCL^{15,16,22,32–37}. Furthermore, additional alterations detected in TLBCL as *TNFAIP3* inactivation or *BCL2* gains have been reported to cooperate with *MYD88*^{L265P}³⁸.

Mutations within genes mediating immune surveillance are key players in the TLBCL pathogenesis, including losses of the HLA class I and II loci, which are associated with

reduced expression of major histocompatibility complexes (MHC)³⁹. In our series, we detected 6p21 (*HLA*) losses in 15% of the cases, and MHC I and MHC II loss of expression in 91% and 62% of cases, respectively. Other studies consistently report that there are twice as many cases of TLBCL lacking MHC I and II expression compared to nodal ABC-DLBCL^{17,39}. Other immune evasion mechanisms described in TLBCL are the 9p24.1 (*PD-L1/PD-L2*) gains or translocations and deletions/mutations of *B2M* gene on 15q21. Chapuy et al.¹⁶ reported *PD-L1* and/or *PDL-L2* gains in half of TLBCL and *PD-L1* or *PD-L2* translocation in 4% of the cases. Nevertheless, the high prevalence of 9p24 alterations was not corroborated in a recent study¹⁷, neither in our cohort. In contrast, we confirmed the prevalence of 15q21 (*B2M*) deletions in TLBCL (21%, 9/43 cases), mutations in 10 cases (24%, 10/42), and concomitant deletions and mutations in 3 cases (8%, 3/40).

The genetic landscape of TLBCL shows some similarities to nodal DLBCL, but it has also distinct features. The genetic instability in TLBCL is driven by *CDKN2A/B* deletions, whereas nodal DLBCL is usually characterized by 13q14 (*RB1*) losses, 8q24 (*MYC*) gains, or *TP53* alterations^{16,40,41}. A noteworthy observation was the marked occurrence of *TBL1XR1* and *MEF2B* mutations in TLBCL compared to nodal DLBCL. *TBL1XR1* mutations modify the humoral immune response by promoting memory B cells and have been linked with extranodal ABC DLBCL that originate from memory B cells⁴². Consistent with previous discoveries in PCNSL²², we observed a simultaneous occurrence of mutations in *MYD88*^{L265P} and *TBL1XR* in 86% (12/14) of the cases. On the other hand, *MEF2B* deregulates the transcription of *BCL6* oncogene⁴³. Lastly, *ETV6* alterations were also more prevalent in TLBCL compared to DLBCL. *ETV6* alterations have been previously detected more frequently in PCNSL than in systemic DLBCL, corroborating the similar genomic profile of both extranodal DLBCL, PCNSL, and TLBCL^{16,44,45}.

Although previous studies pointed to some common genetic alterations between TLBCL and PCNSL, a distinguishing feature of our study is the relatively large sample size (40 patients with genomic analysis) and the integration of targeted NGS and CNAs arrays, with a substantially higher number of evaluated genes (115 genes). Compared to PCNSL, TLBCL did not show major differences in CNA or mutational profile. A potential constraint of our study is that we employed targeted sequencing rather than whole-exome or whole-genome sequencing methods, which would have allowed for the assessment of genes not encompassed in our panel design.

Due to the number of cases, it was difficult to find significant correlations with prognosis in the current study. Nevertheless, it is noteworthy that patients carrying *ATM* and *SPEN* alterations had a shorter PFS. *ATM* is a well-known key regulator of the double-

strand break DNA damage response pathway and cooperates with other key kinases of DNA damage. *ATM* has been described as recurrently altered in chronic lymphocytic leukemia and conventional mantle cell lymphoma, facilitating the development of structural genomic complexity of these tumors with a negative impact on the outcome of the patients^{46–48}. *SPEN* alterations, a gene that encodes a hormone-inducible transcriptional repressor, have been previously described in indolent and aggressive lymphomas and associated with poor PFS^{49,50}.

In conclusion, our comprehensive analysis of the mutational profile and CNAs in TLBCL revealed frequent alterations that overlap with that of another aggressive lymphoma arising in an immunoprivileged site, PCNSL. Our findings demonstrated that TLBCL has a distinctive genomic signature, supporting its recognition as a separate entity from DLBCL, encouraging the grouping of primary large B-cell lymphoma of the testis and CNS, and might provide relevant information to tailor therapeutic approaches.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was mainly developed at the Centre Esther Koplowitz (CEK), Barcelona, Spain. The authors thank the Hematopathology Collection registered at the Biobank of Hospital Clínic-IDIBAPS for sample procurement. We want to particularly acknowledge patients and Biobank HUB-ICO-IDIBELL (PT20/00171) integrated in the Spanish Biobank Network and Xarxa Banc de Tumors de Catalunya (XBTC) for their collaboration. We are indebted to the IDIBAPS Genomics core facility. We are grateful to Sílvia Ruiz, Sílvia Martín, and Núria Russiñol for their technical and logistic assistance.

FUNDING

This study was supported by Fundación Asociación Española Contra el Cancer AECC/CIBER: PROYE18020BEA (S.B.); Fondo de Investigaciones Sanitarias, Instituto de Salud Carlos III Instituto de Salud Carlos III, “Cofinanciado por la Unión Europea” and Fondos FEDER: European Regional Development Fund “Una manera de hacer Europa”: PI17/01061 (S.B.), PI19/00887 (A.L-G. and E.G.), PI22/00203 (S.B. and E.G.) and INT20/00050 (A.L-G); Ministerio de Ciencia e Innovación: PID2021-123054OB-I00 (E.C.), Marató TV3-Cancer/ 201904-30 (S.B.); Generalitat de Catalunya, Suport Grups de Recerca AGAUR: 2021-SGR-01293 (S.B.), 2021-SGR-01274 (E.G.), 2021-SRG-01172 (E.C.). The ICGC MMML-seq Project was supported by the German Ministry of Science and Education (BMBF) in the framework of the ICGC MMML-Seq (01KU1002A-J) and the ICGC DE-Mining (01KU1505G and 01KU1505E). A.R-D is supported by a grant from Fundación Española de Hematología y Hemoterapia. C.L. is supported by a postdoctoral Beatriu de Pinós grant from Secretaria d'Universitats i Recerca del Departament d'Empresa i Coneixement de la Generalitat de Catalunya and by Marie Skłodowska-Curie COFUND program from H2020 (2018-BP-00055). F.N. is supported by the American Association for Cancer Research (2021 AACR-Amgen Fellowship in Clinical/Translational Cancer Research, 21-40-11-NADE), the European Hematology Association (EHA Junior Research Grant 2021, RG-202012-00245), and the Lady Tata Memorial Trust (International Award for Research in Leukaemia 2021-2022, LADY_TATA_21_3223). E.C. is an Academia Researcher of the "Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats" of the Generalitat de Catalunya.

AUTHORSHIP

Contribution: A.R-D., and C.L., analyzed and interpreted data and wrote the manuscript. G.C. performed statistical and clinical analyses. F.N. performed bioinformatic analysis. G.F., J.B., F.C., and E.C. reviewed the H-E and immunostains. A.R-D., and C.L. performed sample preparation and centralized clinical data. M.A., G.T-P, L.L., C.B., N.K., N.V., T.B., A.MG-S, JM. S., A. M., E.G-B, E.M., and E.G., provided samples and/or clinical data. A.E. contributed to panel design. K.K., and I.S., generated and provided data from the nodal DLBCL cohort J.R., N.I., S.W., FL. H. and R.S. generated and provided data from the PCNSL cohort. A.R-D, C.L., M.G., F.N., G.C., A.L-G, and S.B. analyzed and interpreted data. S.B. and A.L-G designed the study, supervised the research, interpreted data, and wrote the manuscript. All authors read, commented on, and approved the manuscript.

FOOTNOTES

Accession code: Our entire genomic data set, including NGS and CNA arrays, has been deposited at the European Genome-phenome Archive under accession number: EGAXXXXXXXX (link will be available at the moment of publication).

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

F.N. has received honoraria from Janssen, AbbVie, and SOPHiA GENETICS for speaking at educational activities. T.B. has received consulting fees or honoraria from Janssen, Roche, Novartis, Merck, Gilead/Kite, Incyte, Lilly, Abbvie, AstraZeneca, and BeiGene. A.M.G-S. has received consulting fees or honoraria from Janssen, Roche, BMS, Celgene, Kyowa Kirin, Clinigen, EUSAPharma, Novartis, Gilead/Kite, Incyte, Lilly, Takeda, ADC Therapeutics America, Miltenyi, Ideogen, Abbvie, and BeiGene. E.C. has been a consultant for Takeda, NanoString, AbbVie, and Illumina; has received research support from AstraZeneca, and honoraria from Janssen, EUSAPharma, and Roche for speaking at educational activities; and is an inventor on a Lymphoma and Leukemia Molecular Profiling Project patent 'Method for subtyping lymphoma subtypes by means of expression profiling' (PCT/US2014/64161). E.G. has received honoraria or consulting fees from Gilead, Kite Pharma, Janssen, Genmab, Miltenyi, Lilly; has received research support from Janssen and travel expenses from Gilead, Kite Pharma. A.L-G. has received honoraria or consulting fees from Roche, Gilead, Kite Pharma, Celgene, Bristol Myers Squibb, Incyte, Takeda, Kern Pharma, Pfizer, Janssen; has received research support from Janssen, Roche, Celgene, Bristol Myers Squibb, and travel expenses from. Roche, Kite/Gilead. The remaining authors declare no competing interests.

REFERENCES

1. Cheah CY, Wirth A, Seymour JF. Primary testicular lymphoma. *Blood* 2014; 123: 486–493.
2. Møller MB, d'Amore F, Christensen BE. Testicular lymphoma: a population-based study of incidence, clinicopathological correlations and prognosis. The Danish Lymphoma Study Group, LYFO. *Eur J Cancer* 1994; 30A: 1760–1764.
3. Menter T, Ernst M, Drachneris J, et al. Phenotype profiling of primary testicular diffuse large B-cell lymphomas. *Hematol Oncol* 2014; 32: 72–81.
4. Alaggio R, Amador C, Anagnostopoulos I, et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Lymphoid Neoplasms. *Leukemia* 2022; 36: 1720–1748.
5. Campo E, Jaffe ES, Cook JR, et al. The International Consensus Classification of Mature Lymphoid Neoplasms: a report from the Clinical Advisory Committee. *Blood* 2022; 140: 1229–1253.
6. Gundrum JD, Mathiason MA, Moore DB, Go RS. Primary testicular diffuse large B-cell lymphoma: A population-based study on the incidence, natural history, and survival comparison with primary nodal counterpart before and after the introduction of rituximab. *J Clin Oncol* 2009; 27: 5227–5232.
7. Fonseca R, Habermann TM, Colgan JP, et al. Testicular lymphoma is associated with a high incidence of extranodal recurrence. *Cancer* 2000; 88: 154–161.
8. Deng L, Xu-Monette ZY, Loghavi S, et al. Primary testicular diffuse large B-cell lymphoma displays distinct clinical and biological features for treatment failure in rituximab era: a report from the International PTL Consortium. *Leukemia* 2016; 30: 361–372.
9. Mazloom A, Fowler N, Medeiros LJ, et al. Outcome of patients with diffuse large B-cell lymphoma of the testis by era of treatment: the M. D. Anderson Cancer Center experience. *Leuk Lymphoma* 2010; 51: 1217–1224.
10. Li D, Xie P, Mi C. Primary testicular diffuse large B-cell lymphoma shows an activated B-cell-like phenotype. *Pathol Res Pract* 2010; 206: 611–615.
11. Al-Abbadi MA, Hattab EM, Tarawneh MS, et al. Primary testicular diffuse large B-cell lymphoma belongs to the nongerminal center B-cell-like subgroup: A study of 18 cases. *Mod Pathol* 2006; 19: 1521–1527.
12. Booman M, Douwes J, Glas AM, et al. Primary testicular diffuse large B-cell lymphomas have activated B-cell-like subtype characteristics. *J Pathol* 2006; 210: 163–171.
13. Wright GW, Huang DW, Phelan JD, et al. A Probabilistic Classification Tool for Genetic Subtypes of Diffuse Large B Cell Lymphoma with Therapeutic Implications. *Cancer Cell* 2020; 37: 551–568.e14.

14. Chapuy B, Stewart C, Dunford AJ, et al. Molecular subtypes of diffuse large B cell lymphoma are associated with distinct pathogenic mechanisms and outcomes. *Nat Med* 2018; 24: 679–690.
15. Kraan W, van Keimpema M, Horlings HM, et al. High prevalence of oncogenic MYD88 and CD79B mutations in primary testicular diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia*; 28: 719–720.
16. Chapuy B, Roemer MGM, Stewart C, et al. Targetable genetic features of primary testicular and primary central nervous system lymphomas. *Blood* 2016; 127: 869–881.
17. Minderman M, Amir A, Kraan W, et al. Immune evasion in primary testicular and central nervous system lymphomas: HLA loss rather than 9p24.1/PD-L1/PD-L2 alterations. *Blood* 2021; 138: 1194–1197.
18. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Revised Fourth Edition. International Agency for Research on Cancer (IARC): Lyon, France, 2017.
19. Cheson BD, Fisher RI, Barrington SF, et al. Recommendations for initial evaluation, staging, and response assessment of hodgkin and non-hodgkin lymphoma: The lugano classification. *J Clin Oncol* 2014; 32: 3059–3067.
20. Cheson BD, Ansell S, Schwartz L, et al. Refinement of the Lugano Classification lymphoma response criteria in the era of immunomodulatory therapy. *Blood* 2016; 128: 2489–2496.
21. Karube K, Enjuanes A, Dlouhy I, et al. Integrating genomic alterations in diffuse large B-cell lymphoma identifies new relevant pathways and potential therapeutic targets. *Leukemia* 2018; 32: 675–684.
22. Radke J, Ishaque N, Koll R, et al. The genomic and transcriptional landscape of primary central nervous system lymphoma. *Nat Commun* 2022; 13: 2558.
23. Mermel CH, Schumacher SE, Hill B, et al. GISTIC2.0 facilitates sensitive and confident localization of the targets of focal somatic copy-number alteration in human cancers. *Genome Biol* 2011; 12: 1–14.
24. Nadeu F, Delgado J, Royo C, et al. Clinical impact of clonal and subclonal TP53, SF3B1, BIRC3, NOTCH1, and ATM mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2016; 127: 2122–2130.
25. Rivas-Delgado A, Nadeu F, Enjuanes A, et al. Mutational Landscape and Tumor Burden Assessed by Cell-free DNA in Diffuse Large B-Cell Lymphoma in a Population-Based Study. *Clin Cancer Res* 2021; 27: 513–521.
26. Ratnaparkhe M, Hlevnjak M, Kolb T, et al. Genomic profiling of Acute lymphoblastic leukemia in ataxia telangiectasia patients reveals tight link between ATM mutations and chromothripsis. *Leukemia* 2017; 31: 2048–2056.

27. Salaverria I, Martín-García D, López C, et al. Detection of chromothripsis-like patterns with a custom array platform for chronic lymphocytic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 2015; 54: 668–680.
28. Ramos-Campoy S, Puiggros A, Kamaso J, et al. TP53 Abnormalities Are Underlying the Poor Outcome Associated with Chromothripsis in Chronic Lymphocytic Leukemia Patients with Complex Karyotype. *Cancers (Basel)* 2022; 14:3715.
29. Parker H, Rose-Zerilli MJJ, Larrayoz M, et al. Genomic disruption of the histone methyltransferase SETD2 in chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia* 2016; 30: 2179–2186.
30. Wong J. Genetic Determinants of Isolated and Systemic Testicular Diffuse Large B-Cell Lymphoma Highlight a Disease Spectrum. 2022.
31. Lacy SE, Barrans SL, Beer PA, et al. Targeted sequencing in DLBCL, molecular subtypes, and outcomes: a Haematological Malignancy Research Network report. *Blood* 2020; 135: 1759–1771.
32. Hernández-Verdin I, Kirasic E, Wienand K, et al. Molecular and clinical diversity in primary central nervous system lymphoma. *Ann Oncol* 2022;34: 186-199.
33. Schrader AMR, Jansen PM, Willemze R et al. High prevalence of MYD88 and CD79B mutations in intravascular large B-cell lymphoma. *Blood* 2018; 131: 2086–2089.
34. Franco F, González-Rincón J, Lavernia J, Mutational profile of primary breast diffuse large B-cell lymphoma. *Oncotarget* 2017; 8: 102888–102897.
35. Gonzalez-Farre B, Ramis-Zaldivar JE, Castrejón De Anta N, et al. Intravascular Large B-Cell Lymphoma Genomic Profile Is Characterized by Alterations in Genes Regulating NF-κB and Immune Checkpoints. *Am J Surg Pathol* 2023; 47: 202–211.
36. Cao XX, Li J, Cai H. Patients with primary breast and primary female genital tract diffuse large B cell lymphoma have a high frequency of MYD88 and CD79B mutations. *Ann Hematol* 2017; 96: 1867–1871.
37. Montesinos-Rongen M, Godlewska E, Brunn A, et al. Activating L265P mutations of the MYD88 gene are common in primary central nervous system lymphoma. *Acta Neuropathol* 2011; 122: 791–792.
38. Wenzl K, Manske MK, Sarangi V, et al. Loss of TNFAIP3 enhances MYD88^{L265P}-driven signaling in non-Hodgkin lymphoma. *Blood Cancer J* 2018; 88: 97.
39. Booman M, Douwes J, Glas AM, et al. Mechanisms and effects of loss of human leukocyte antigen class II expression in immune-privileged site-associated B-cell lymphoma. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 2698–2705.

40. Monti S, Chapuy B, Takeyama K, et al. Integrative Analysis Reveals an Outcome-associated and Targetable Pattern of p53 and Cell Cycle Deregulation in Diffuse Large B-cell Lymphoma. *Cancer Cell* 2012; 22: 359.
41. Hernando E, Nahlé Z, Juan G et al. Rb inactivation promotes genomic instability by uncoupling cell cycle progression from mitotic control. *Nature* 2004; 430: 797–802.
42. Venturutti L, Teater M, Zhai A, et al. TBL1XR1 Mutations Drive Extranodal Lymphoma by Inducing a Pro-tumorigenic Memory Fate. *Cell* 2020; 182: 297-316.e27.
43. Ying CY, Dominguez-Sola D, Fabi M, et al. MEF2B mutations lead to deregulated expression of the oncogene BCL6 in diffuse large B cell lymphoma. *Nat Immunol* 2013; 14: 1084–1092.
44. Mo SS, Geng H, Cerejo M, et al. Next-Generation Sequencing of Newly-Diagnosed Primary CNS Lymphoma Reveals Alterations in BTG1, ETV6, and 6p Are Associated with Chemoresistance and Inferior Progression-Free Survival. *Blood* 2022; 140: 3516–3517.
45. Bruno A, Boisselier B, Labreche K, et al. Mutational analysis of primary central nervous system lymphoma. *Oncotarget* 2014; 5: 5065–5075.
46. Nadeu F, Martin-Garcia D, Clot G, et al. Genomic and epigenomic insights into the origin, pathogenesis, and clinical behavior of mantle cell lymphoma subtypes. *Blood* 2020; 136: 1419–1432.
47. Puente XS, Beà S, Valdés-Mas R et al. Non-coding recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature* 2015; 526: 519–524.
48. Landau DA, Tausch E, Taylor-Weiner AN, et al. Mutations driving CLL and their evolution in progression and relapse. *Nature* 2015; 526: 525–530.
49. Lee B, Lee H, Cho J, et al. Mutational Profile and Clonal Evolution of Relapsed/Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Front Oncol* 2021; 11:628807.
50. Bonfiglio F, Bruscaggin A, Guidetti F, et al. Genetic and phenotypic attributes of splenic marginal zone lymphoma. *Blood* 2022; 139: 732–747.

Table 1. Main baseline features, treatment, and response of the 61 patients with TLBCL

CHARACTERISTICS	N (%)
Median age (range)	70 (30-89)
ECOG-PS ≥ 2	6/48 (12)
B symptoms	6/55 (11)
LDH >UNL	19/50 (38)
Bone marrow infiltration	4/59 (7)
CNS involvement	6/60 (10)
Stage	
I	30 (49)
II	13 (21)
IV	18 (30)
COO Hans' algorithm	
Germinal center B-cell	9/53 (17)
Non- Germinal center B-cell	44/53 (83)
COO LymphC2x	
Germinal center B-cell	7/42 (17)
Activated B-cell	30/42 (71)
Unclassified	5/42 (12)
FISH	
<i>MYC</i> rearrangement	4/50 (8)
<i>BCL2</i> rearrangement	2/45 (4)
<i>BCL6</i> rearrangement	17/47 (36)
IPI	
Low risk	27/49 (55)
Low-Intermediate risk	9/49 (18)
High-Intermediate risk	3/49 (6)
High risk	10/49 (21)
HLA loss	
HLA class I	37/41 (91)
HLA class II	28/43 (62)
Treatment	
R-CHOP	47 (77)
Intensive chemoimmunotherapy	5 (8)
R-CVP/R-GEMOX	4 (7)
Died before starting treatment or palliative care	5 (8)
Response to treatment	
Complete response	45/56 (80)
Partial response	1/56 (2)
Progressive disease	10/56 (18)

ECOG-PS: Eastern Cooperative Oncology Group performing status; FISH: Fluorescence in situ hybridization; UNL: Upper normal limit; CNS: Central nervous system; COO: cell-of-origin; IPI: International Prognostic Index. R-CHOP: rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, prednisone, R-CVP: rituximab, cyclophosphamide, vincristine, and prednisone; R-GEMOX: rituximab, gemcitabine, and oxaliplatin.

Figure 1. Copy number profile of TLBCL. Copy number profile (left panel) and copy number loss of heterozygosity (CN-LOH) (right panel) of 43 TLBCL. On the y-axis, the chromosomes are represented vertically from 1 to X (chromosome Y is excluded); on the x-axis, the percentages of patients with CNA and CN-LOH are shown with gains in blue, losses in red, and CN-LOH in yellow. Regions with CNA and CN-LOH frequency $\geq 10\%$ and potential target genes are indicated.

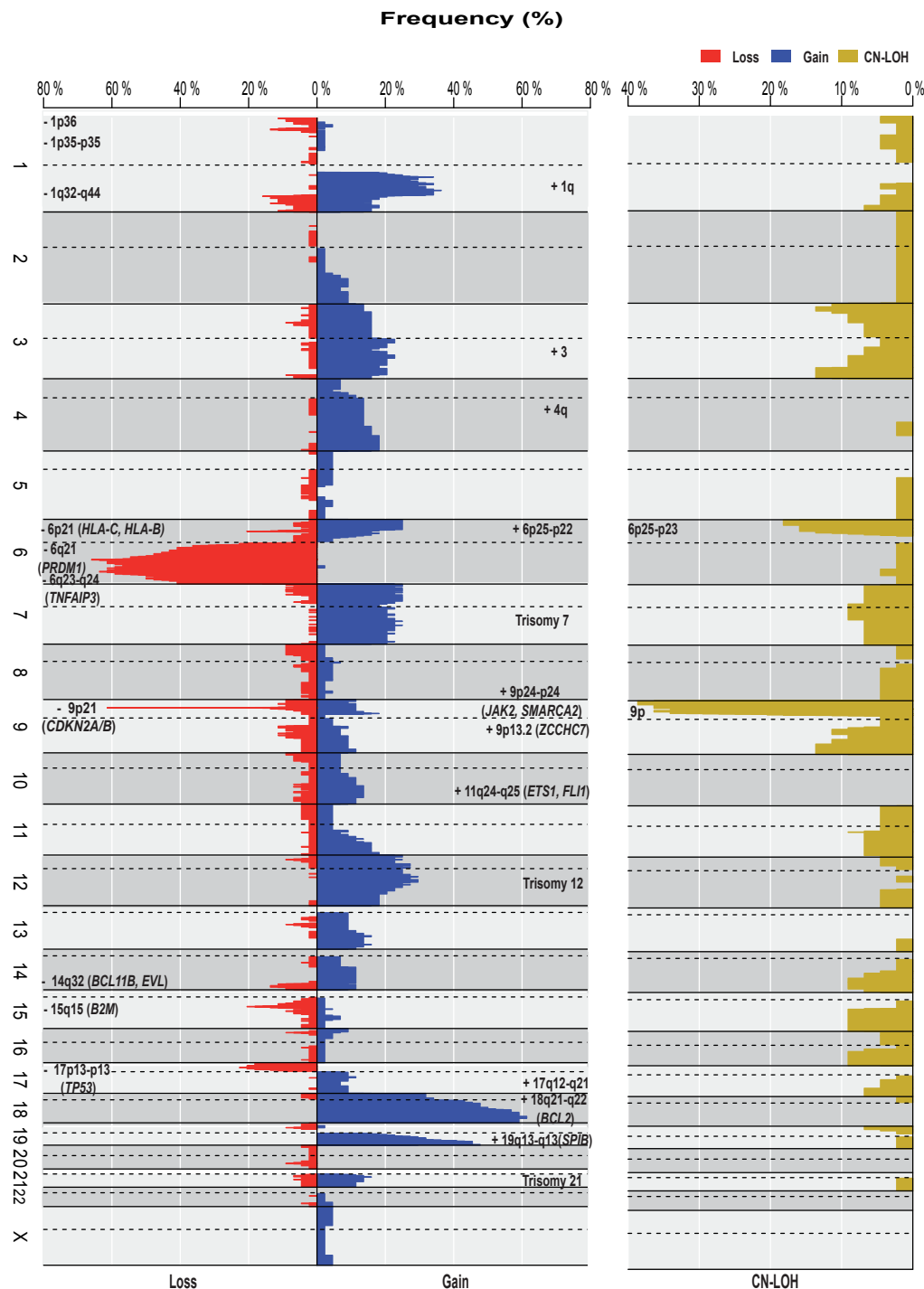


Figure 2. Recurrent genomic alterations in TLBCL according to disease stage. The Oncoprint encompasses the 40 samples analyzed using next-generation sequencing and copy number analysis. Each column represents one tumor sample, and each row represents one gene/region. Altered genes and genomic regions with a frequency $\geq 10\%$ are ordered by decreasing frequency. From top to bottom: stage of the disease; COO by Hans' algorithm and Lymph2Cx; *MYC*, *BCL2*, and *BCL6* rearrangements; molecular subgroups according to LymphGen analysis; single nucleotide variants (SNVs), small insertions/deletions (indels) and copy number alterations (CNA). *Low coverage, higher probability of false positives.

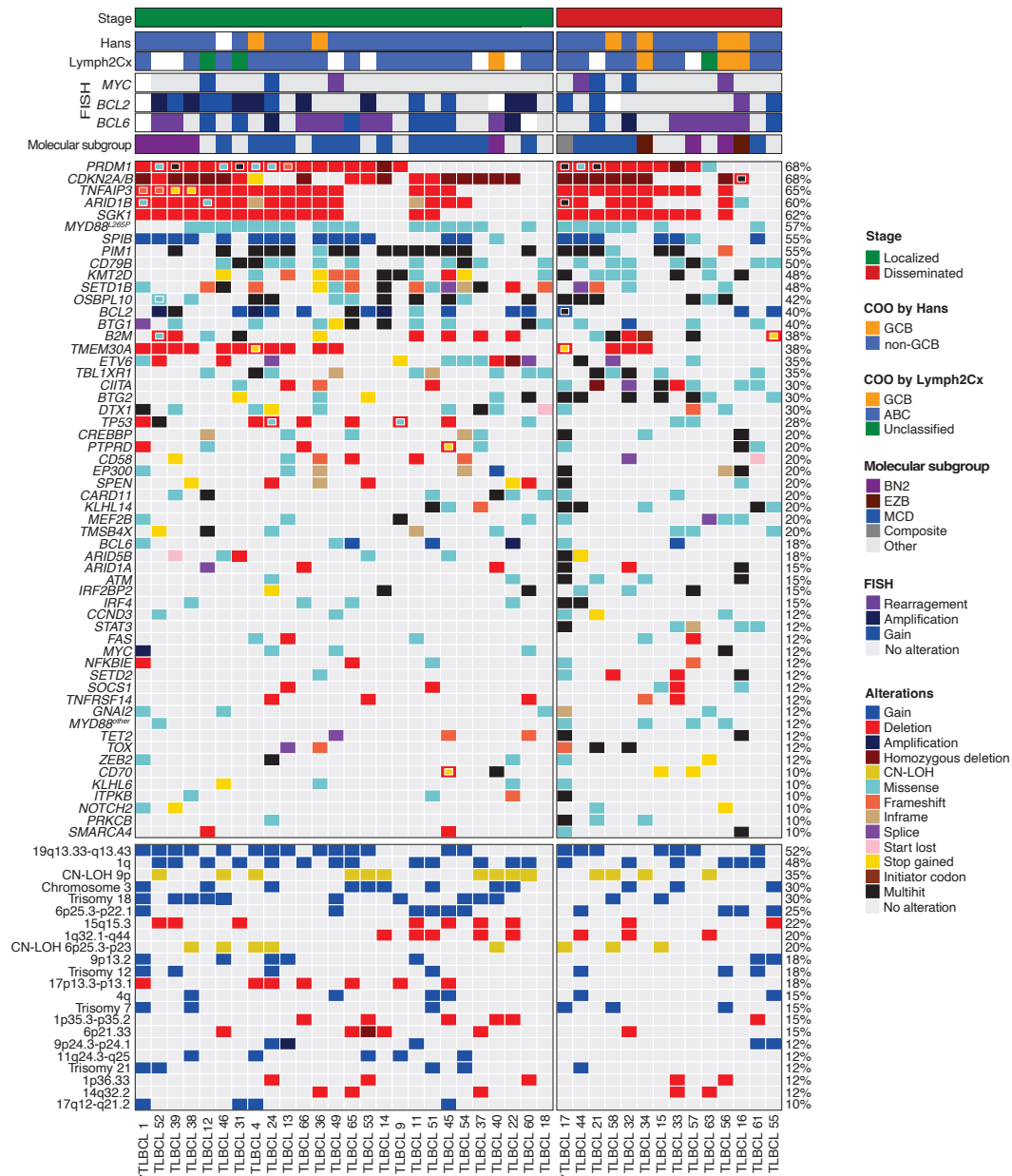
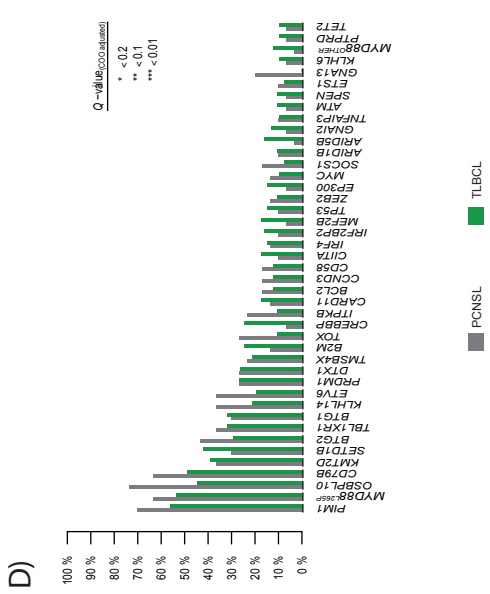
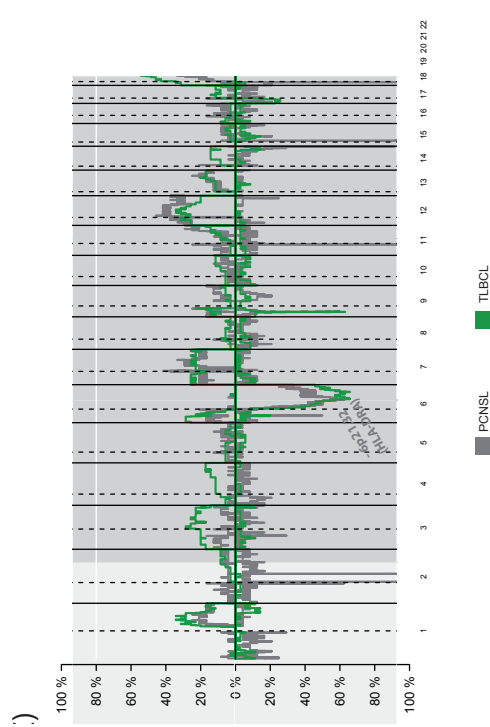
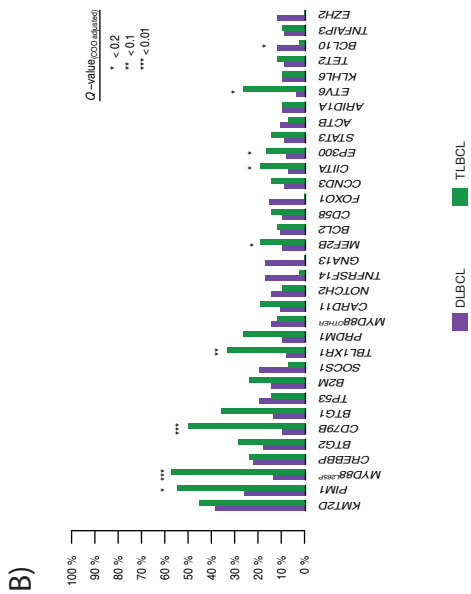
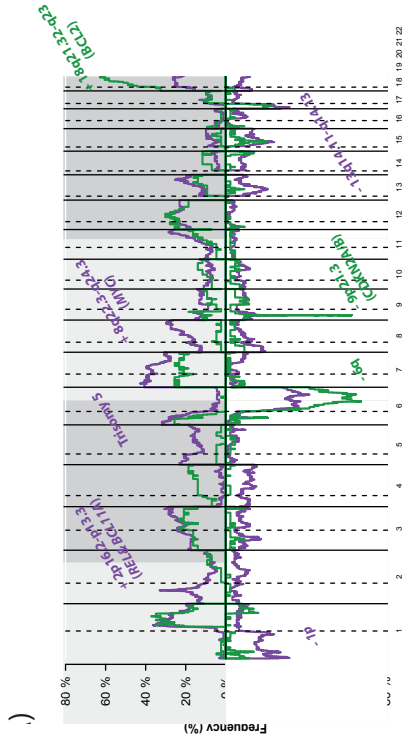


Figure 3. Comparison of the CNA and mutation frequencies between TLBCL, DLBCL, or PCNSL. (A) Comparison of CNA between TLBCL cases and nodal DLBCL, highlighting biologically relevant regions with differential frequency (color denotes the enriched group). (B) Comparison of gene mutation frequencies in TLBCL vs. DLBCL, showing genes mutated in more than 8% of cases between the two series. (C) A comparative plot of copy number alterations between TLBCL cases and PCNSL, highlighting the biologically relevant region with differential frequency. PCNSL CNA segments with lengths below 100k bp were filtered out for this comparison. Frequent alterations in centromeric and telomeric regions and IG loci (IGK, IGH, and IGL) were displayed but not indicated as differentially altered regions since they were not filtered out in the PCNSL series. (D) Comparison of gene mutation frequencies in TLBCL vs. PCNSL showing genes altered in more than 8% of cases between the two series. *Denotes adjusted P-value (Q-value) thresholds when comparing the two series. # Depending on the gene.



Supplementary Material

Supplementary methods

Clinical and evolutionary characteristics

The main clinico-biological and evolutionary characteristics were recorded and analyzed. These variables included: i) clinical data: age, performance status according to the Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) scale, presence of B symptoms; ii) hematological and biochemical parameters: white blood cell and lymphocyte counts, hemoglobin, serum lactate dehydrogenase (LDH) and β 2-microglobulin levels; iii) tumor burden data: nodal and extranodal involvement, bone marrow infiltration, and Ann Arbor Stage; and iv) the International Prognostic Index (IPI)¹.

Immunohistochemistry (IHC)

HLA class I and class II expression were analyzed using anti-Human MHC Class I (HLA-A, AB52922) and anti-Human MHC Class II (HLA-DR, MA511966) from Abcam and ThermoFisher, respectively. Both stainings were evaluated in all TLBCL with available tumor material and selected diffuse large B cell lymphoma not otherwise specified (DLBCL-NOS) as controls (Supplementary Table 1).

Fluorescent *in situ* hybridization (FISH) analyses

FISH studies were performed using *BCL6*, *MYC*, *BCL2*, and *JAK2* break-apart probes from Metasystems, Altlußheim, Germany and dual color dual fusion probes for *IGH::MYC* and *IGH::BCL2* from Metasystems, Altlußheim, Germany in some cases. A *IRF4* homemade FISH probe² was used in the cases triple positive CD10+/MUM1+/BCL6+ by immunohistochemistry. All hybridizations were performed according to the manufacturer's protocols. At least 100 nuclei were examined for each probe whenever possible. Digital image acquisition, processing, and evaluation were performed using ISIS digital image analysis version 5.0 (MetaSystems).

Copy number alteration (CNA) analysis

CNA were analyzed using the Oncoscan CNV FFPE assay (ThermoFisher Scientific, Massachusetts, USA). Nexus version 9.0 Discovery Edition software (Biodiscovery, El Segundo, CA) was used to analyze and visualize gains, losses and copy neutral loss of heterozygosity (CN-LOH). The human reference genome was GRCh37/hg19. Gains and losses with a minimum size of 100kb and terminal CN-LOH larger than 10 Mb were considered. Exceptionally, focal copy number alterations smaller than 100 kb or CN-

LOH smaller than 10Mb were recognized if they included a driver gene or recurrently altered region previously described in DLBCL. GISTIC algorithm (2.0.23) was used to identify driver CNA³. A chromothripsis pattern was defined when at least seven switches between two or more copy number states were detected on an individual chromosome⁴. Furthermore, information from CNA analysis was merged with SNV/indels from the targeted sequencing data to classify 44 genes as normal/altered for subsequent analyses.

Next generation sequencing (NGS)

Single nucleotide variants (SNVs) and insertions /deletion (indels) were evaluated using a B-cell malignancy-oriented targeted panel previously described capturing 121 genes, and an updated version capturing 136 genes⁵. The 115 genes overlapping between both versions were analyzed in 42 TLBCL samples. Libraries were generated from 150 ng of DNA using molecular-barcoded library adapters (ThruPLEX Tag-seq kit; Takara) coupled with a custom hybridization capture-based method (SureSelectXT Target Enrichment System Capture strategy, Agilent Technologies). The quality of the libraries was determined using the Bioanalyzer high-sensitivity DNA kit (Agilent) and quantified by PCR using the KAPA library quantification kit (KAPA Biosystems). Finally, the libraries were pooled and sequenced 2x150 bp in the MiSeq or NextSeq instrument (Illumina). The bioinformatic analysis was performed using an updated version of our in-house pipeline, described in previous publications^{1,6}. To perform an integrative genomic analysis, selected genes and genomic regions were considered altered if they had SNVs/indels and/or CNA (except CN-LOH, which were not integrated with mutational data).

Bioinformatic analyses

Variant calling was performed using an updated version of our in-house pipeline⁶. Briefly, raw reads were trimmed using the SurecallTrimmer (v4.0.1, AGeNT, Agilent). Alignment of the trimmed reads was performed using BWA-MEM algorithm⁷, PCR or optical duplicates were marked using MarkDuplicates from Picard (RRID: SCR_006525), and the base quality score recalibration was performed using GATK's BaseRecalibrator and ApplyBQSR functions (RRID: SCR_001876 v4.0). Variant calling was performed in parallel using VarScan2 (v2.4.3)⁸, Mutect2, VarDictJava (v1.4)⁸, LoFreq (v2.1.3.1)⁹, outLyzer (v1.0)¹⁰, and freebayes (v1.1.0)¹¹. Variants identified were annotated using snpEff/snpSift (v4.3t). Only variants that were identified as "PASS" by

at least 3 of the algorithms and with variant allele frequency (VAF) $\geq 5\%$ were considered.

Variants reported in the 1000 Genome Project, ExAC, and/or gnomAD with a population frequency $>1\%$ were considered polymorphisms and therefore removed from the analysis. To further filter out non-recurrent polymorphisms, variants were only considered somatic if i) they were not reported as germline in our custom ICGC database of 506 WGS/WES¹², and were ii) reported as somatic in a lymphoid neoplasm in COSMIC database, iii) truncating, or iv) predicted as potentially damaging by at least one of the following algorithms: CADD (phred score > 10), PolyPhen2 (score > 0.9), SIFT (score < 0.1), MutationAssessor (score > 2) and Provean (deleterious).

Supplementary Tables

Supplementary Table 1. Immunohistochemistry of HLA-A and HLA-DR in Diffuse Large B-cell Lymphoma. Provided as Excel spreadsheet.

Supplementary Table 2. Biological characteristics of the cohort and genomic techniques applied to each sample. Provided as Excel spreadsheet.

Supplementary Table 3. Genes and genomic regions included in the B-cell malignancy-oriented targeted sequencing panel. Provided as Excel spreadsheet.

Supplementary Table 4. Copy number alterations and copy neutral loss of heterozygosity detected in TLBCL. Provided as Excel spreadsheet.

Supplementary Table 5. Minimal regions defined in at least five cases (driver CNAs by GISTIC). Provided as Excel spreadsheet.

Supplementary Table 6. Coverage of target sequencing achieved in TLBCL samples. Provided as Excel spreadsheet.

Supplementary Table 7. List of somatic variants (SNVs/indels) identified in TLBCL samples using targeted next-generation sequencing. Provided as Excel spreadsheet.

Supplementary Table 8. Localized vs. systemic TLBCL. Provided as Excel spreadsheet.

Supplementary Table 9. Copy number comparison of TLBCL and DLBCL. The two series were compared only in copy number alterations present in at least 8 cases. Provided as Excel spreadsheet.

Supplementary Table 10. Comparison of gene mutation frequencies in TLBCL versus nodal DLBCL. The two series were compared only in genes altered in at least 8 cases. Provided as Excel spreadsheet.

Supplementary Table 11. Comparison of frequencies of biallelic alterations in TLBCL versus nodal DLBCL. Provided as Excel spreadsheet.

Supplementary Table 12. Copy number comparison of TLBCL and PCNSL. The two series were compared only in copy number alterations present in at least 8 cases. Provided as Excel spreadsheet.

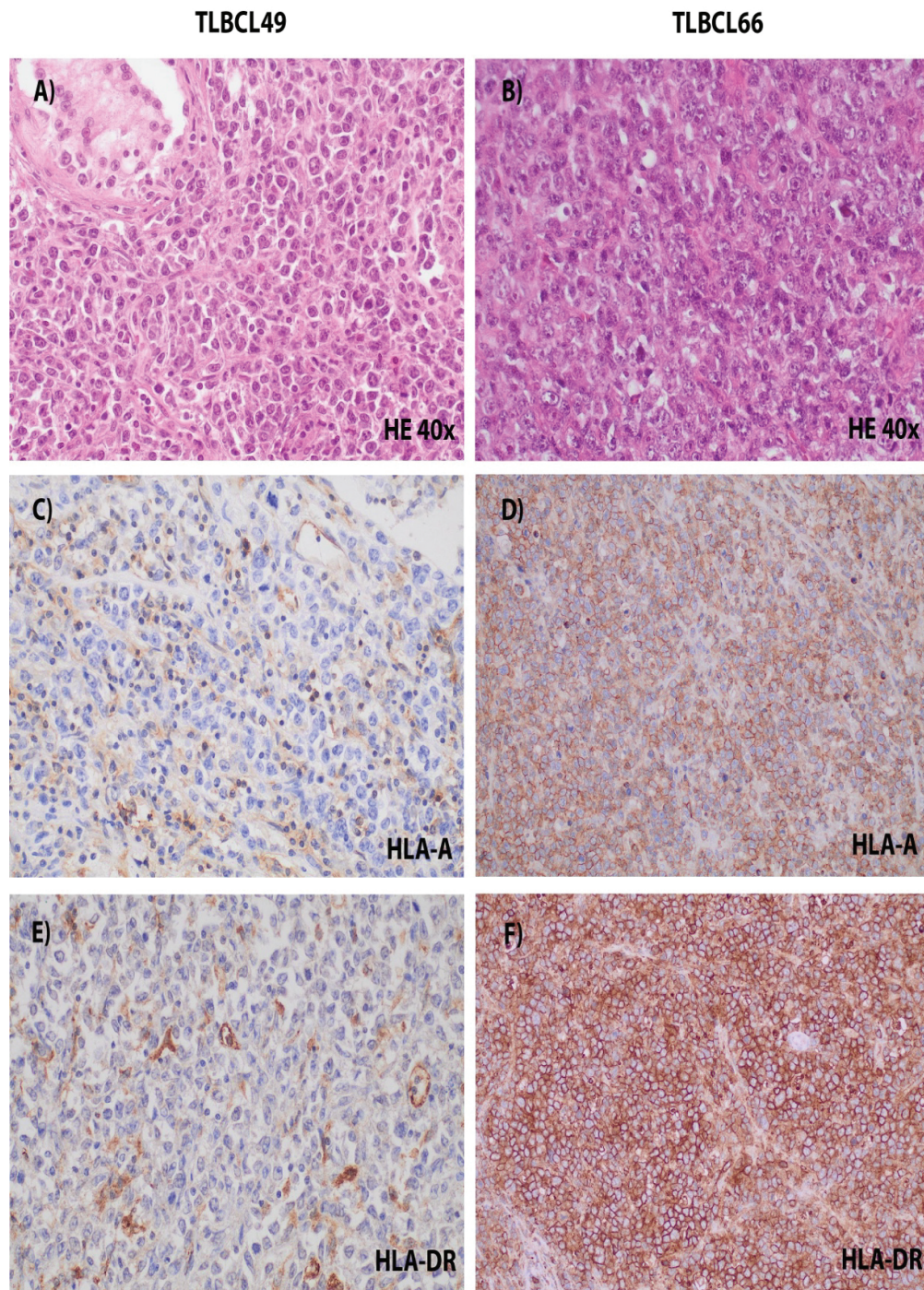
Supplementary Table 13. Comparison of gene mutation frequencies in TLBCL versus nodal DLBCL. The two series were compared only in genes altered in at least 8 cases. Provided as Excel spreadsheet.

Supplementary Table 14. Association between the initial clinical characteristics and survival. Provided as Excel spreadsheet.

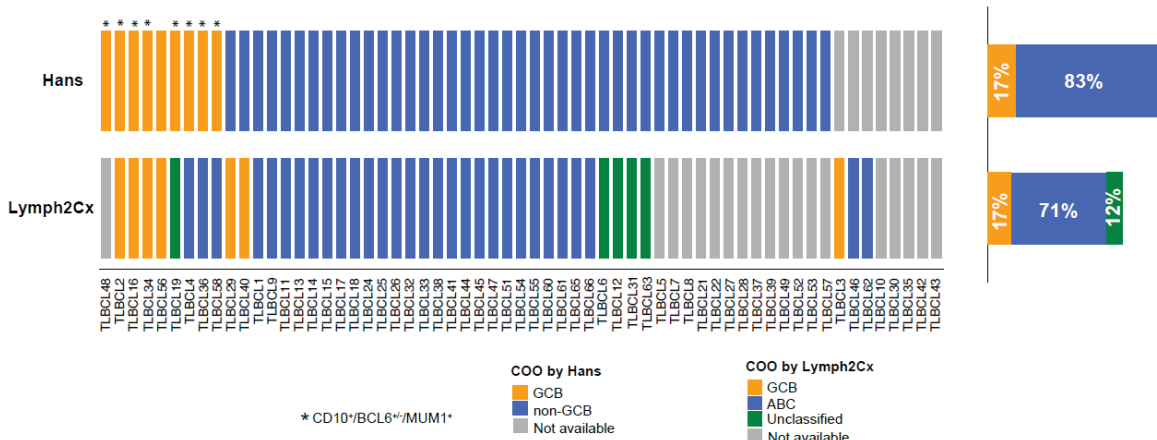
Supplementary Table 15. Association between alterations and progression-free survival (PFS). The association was only evaluated in the alterations present in at least 6 cases. Provided as Excel spreadsheet.

Supplementary Figures

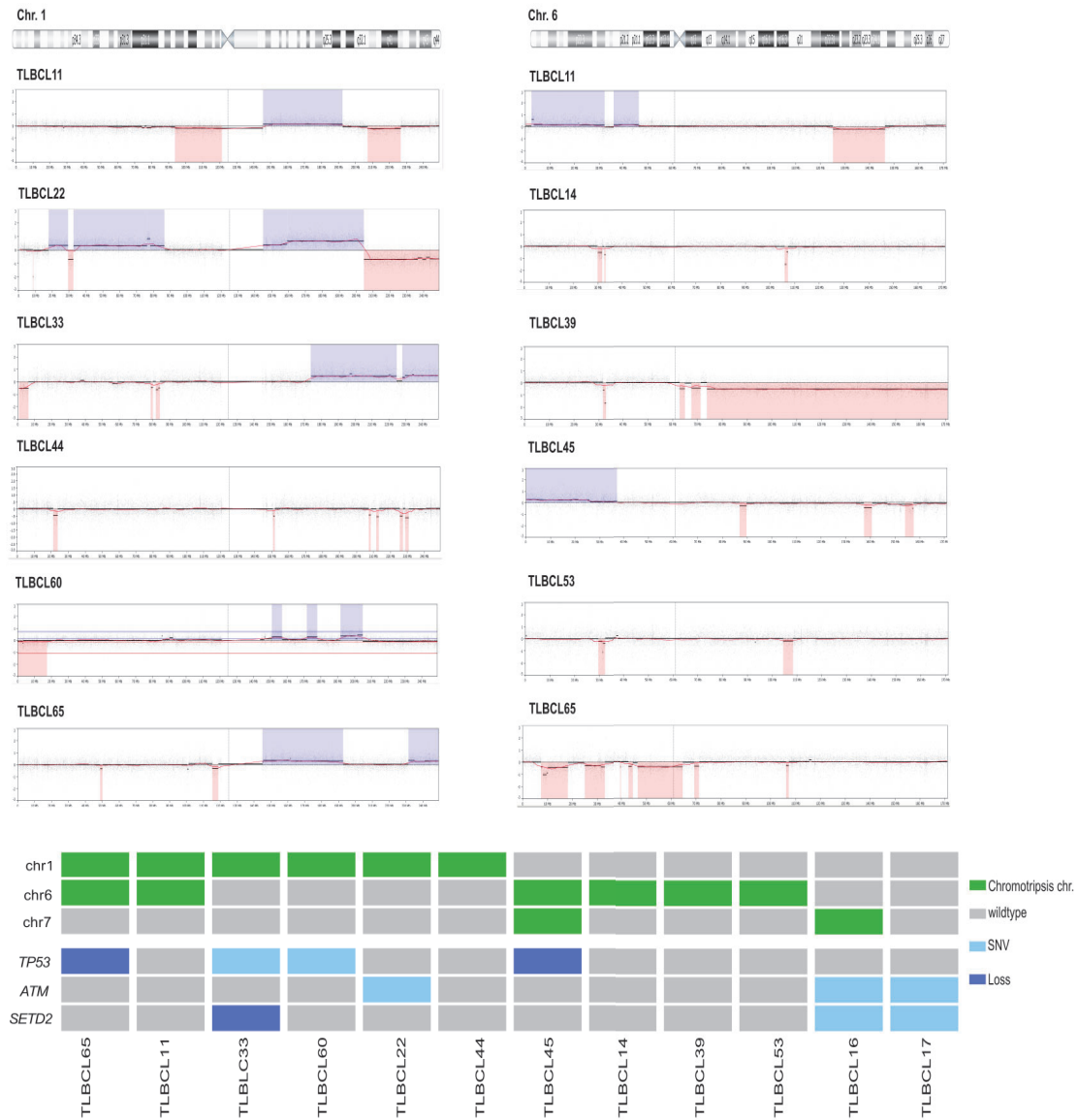
Supplementary Figure 1. HLA-A and HLA-DR immunohistochemistry. Morphologic and immunophenotypic features of TLBCL (cases #49 and #66). A-B, Numerous large and atypical lymphocytes with a diffuse growth pattern (hematoxylin and eosin). C-D, HLA-A negative and HLA-A -positive (in brown) tumoral cells. E-F, HLA-DR negative and HLA-DR -positive (in brown) tumoral cells.



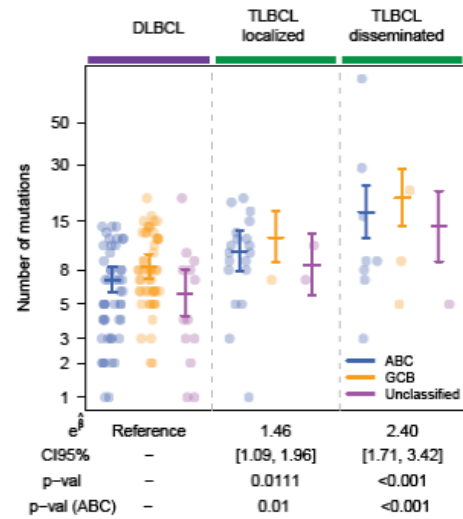
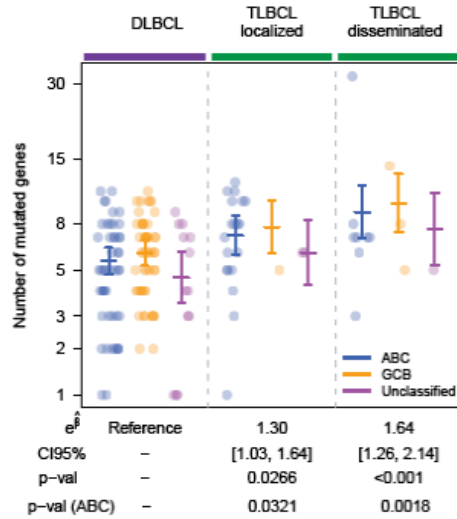
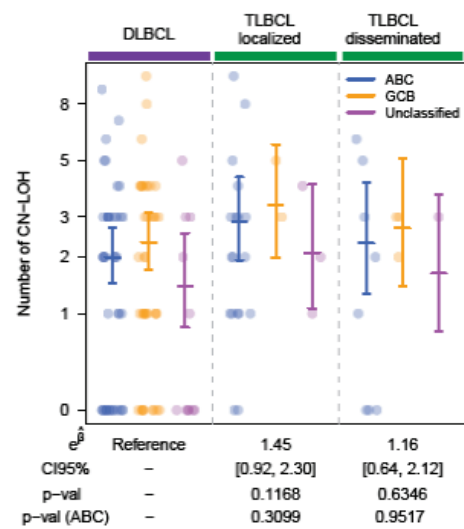
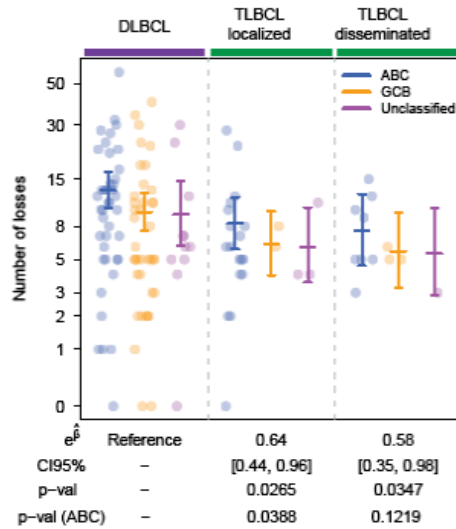
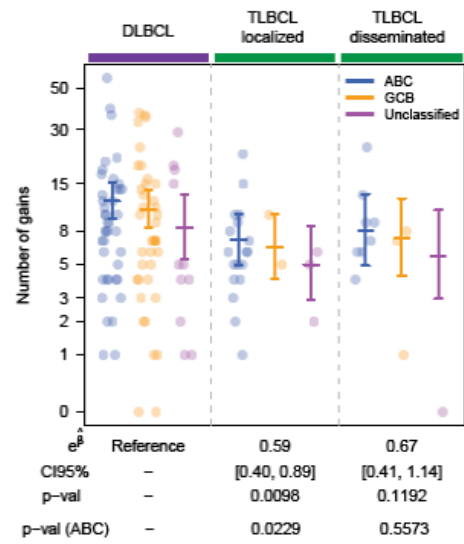
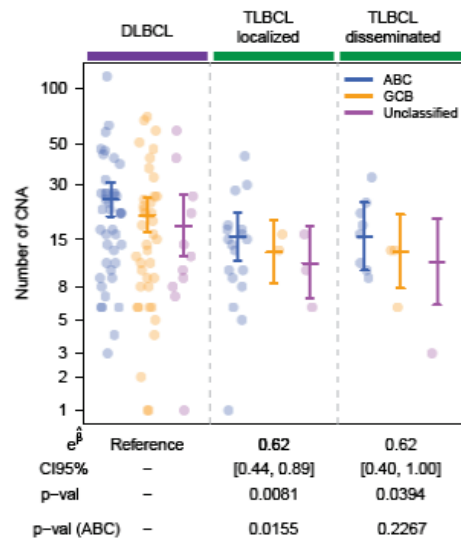
Supplementary Figure 2. Cell of origin based on Hans algorithm and Lymph2Cx.
 Each column represents a case. *Denotes cases with ambiguous phenotype CD10+/BCL6±/MUM1+ by Hans' algorithm.



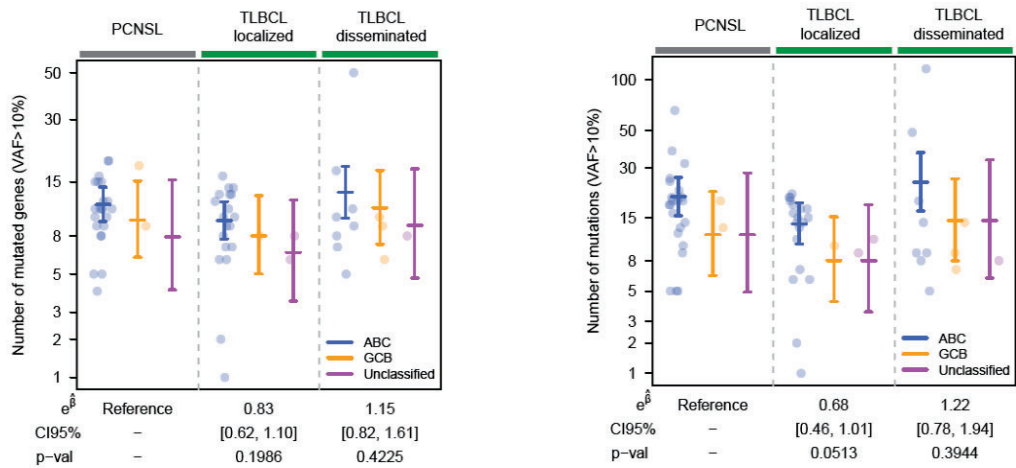
Supplementary Figure 3. Chromothripsis affecting chromosomes 1 and 6 in TLBCL and its association with *TP53*, *ATM*, and *SETD2* alterations. Copy number profile of chromosomes 1 (left column) and chromosome 6 (right column) affected by chromothripsis in TLBCL. Copy number gains (blue) and losses (red) are displayed. Oncoprint displays the chromosome affected by chromothripsis and the genomic status of relevant genes previously associated with genomic instability. Light blue, dark blue, and gray indicate single nucleotide variants (SNVs), copy number loss, and wild type, respectively. Note, chr., chromosome.



Supplementary Figure 4. Genomic complexity in DLBCL and TLBCL. From up to down plots showing for each case the number of CNA, gains, losses, copy neutral loss of heterozygosity (CN-LOH), mutated genes, and the number of mutations in DLBCL and TLBCL (localized and systemic). Different colors are used for ABC, GCB, and Unclassified. Represented as segments are the 95% confidence intervals (CI) for the mean of each group, obtained from a negative binomial regression model, which includes the COO as a covariate. Displayed in the lower part of each plot are the results for the regression coefficients corresponding to the comparison of DLBCL versus TLBCL localized and DLBCL vs. TLBCL systemic (exponential of the point estimate and 95% CI, and the *P*-value). The *P*-value obtained when only the ABC samples are compared is also shown. The regression coefficients of the COO covariate are not shown.

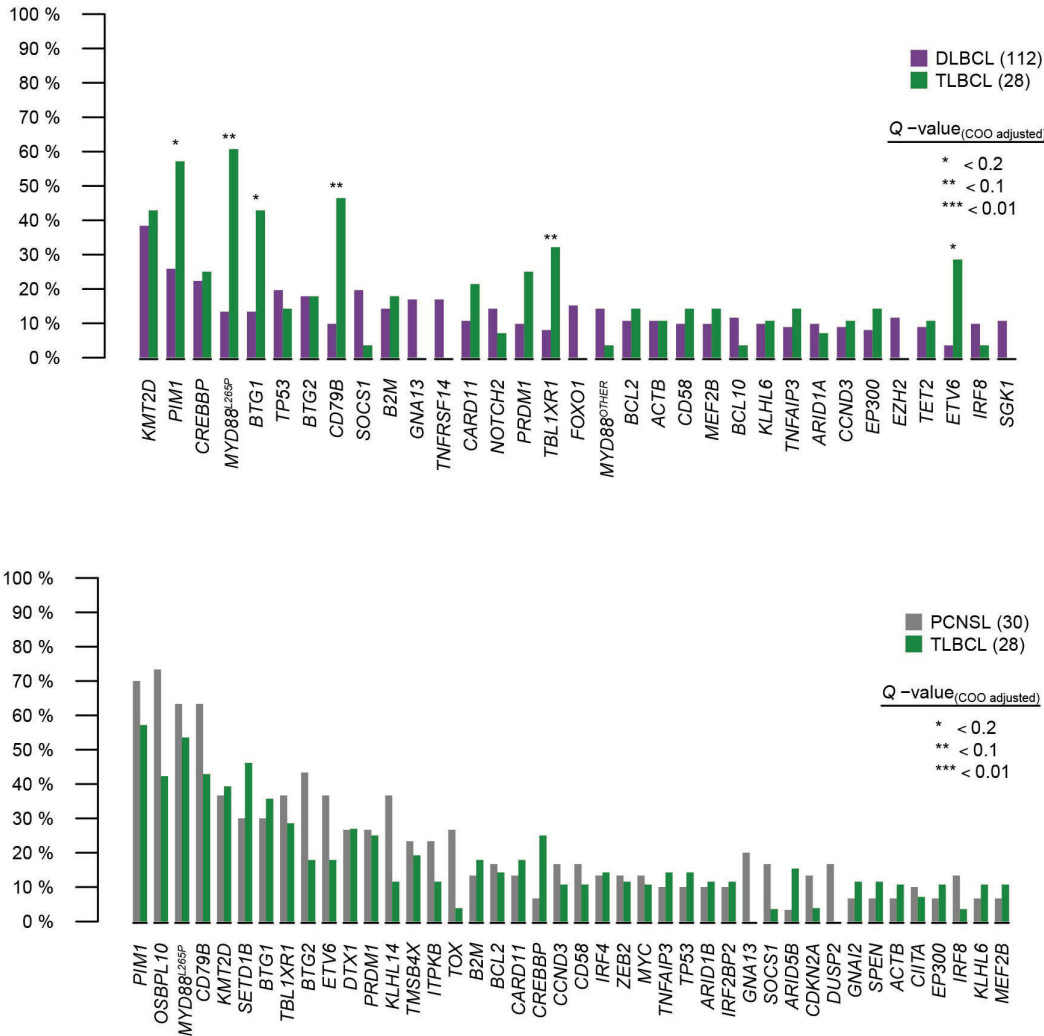


Supplementary Figure 5. Genomic complexity in PCNSL and TLBCL. From left to right, plots show for each case the number of mutated genes and the number of mutations in PCNSL and TLBCL (localized and disseminated). Different colors are used for ABC, GCB, and Unclassified. Represented as segments are the 95% confidence intervals (CI) for the mean of each group, obtained from a negative binomial regression model, which includes the COO as a covariate. Displayed in the lower part of each plot are the results for the regression coefficients corresponding to the comparison of PCNSL versus TLBCL localized and PCNSL vs. TLBCL disseminated are displayed in the lower part of each plot (exponential of the point estimate and 95% CI and the *P*-value). The regression coefficients of the COO covariate are not shown.



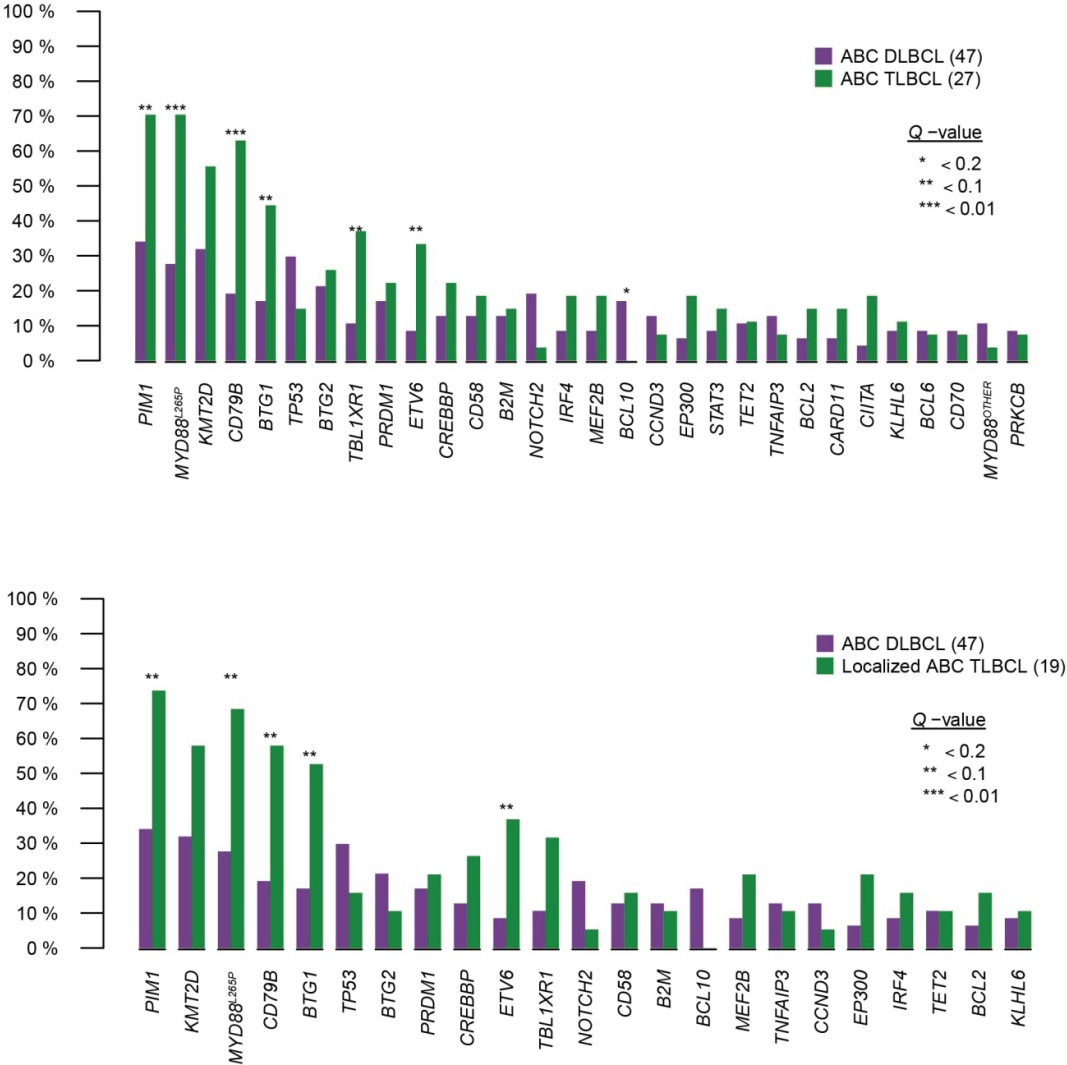
Supplementary Figure 6. Comparison of mutation frequencies between TLBCL localized and DLBCL or PCNSL.

The upper plot showed the comparison of gene mutation frequencies in TLBCL localized vs DLBCL. The lower plot exhibited the comparison of gene mutation frequencies in TLBCL localized vs PCNSL. Only genes altered in > 8% of the cases between the two series are shown. Asterisks denote several adjusted *P*-value (*Q*-value) thresholds when comparing the two series. TLBCL mutations with VAF <10% were filtered out for this comparison.



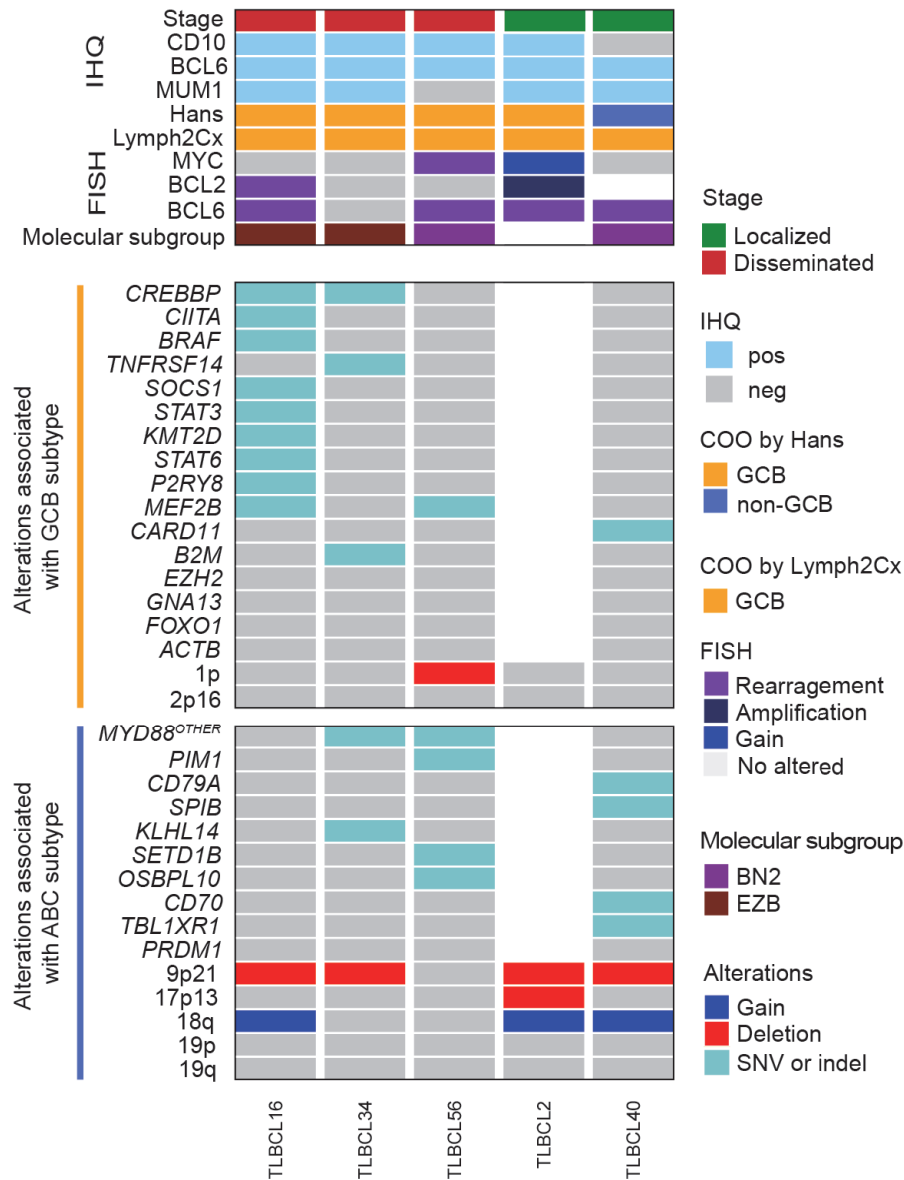
Supplementary Figure 7. Comparison of mutation frequencies between localized ABC TLBCL and ABC DLBCL.

The upper plot showed the comparison of gene mutation frequencies in ABC TLBCL vs ABC DLBCL. The lower plot exhibited the comparison of gene mutation frequencies in localized ABC TLBCL vs ABC DLBCL. Only genes altered in more than 8% of the cases between the two series are shown. Asterisks denote several adjusted P-value (Q-value) thresholds when comparing the two series.



Supplementary Figure 8. Genomic profile of GCB-TLBCL cases

The oncoprint displays the 5 TLBCL cases with GCB phenotype based on Lymph2Cx assay. Each column represents one tumor sample, and each row represents one gene/region. The genes/genomic regions included in the oncoprint have been previously associated with GCB or ABC subtype^{13,14}. From top to bottom: stage of the disease; IHC (CD10, BCL6, and MUM1), COO by Hans algorithm and Lymph2Cx; *MYC*, *BCL2*, and *BCL6* rearrangements, molecular subgroups according to LymphGen analysis; and single nucleotide variants (SNVs), small insertions/deletions (indels) and copy number alterations (CNA).



REFERENCES

1. Rivas-Delgado A, Nadeu F, Enjuanes A, et al. Mutational Landscape and Tumor Burden Assessed by Cell-free DNA in Diffuse Large B-Cell Lymphoma in a Population-Based Study. *Clin Cancer Res* 2021; 27: 513–521.
2. Salaverria I, Philipp C, Oschlies I, et al. Translocations activating IRF4 identify a subtype of germinal center-derived B-cell lymphoma affecting predominantly children and young adults. *Blood* 2011; 118: 139–147.
3. Mermel CH, Schumacher SE, Hill B, et al. GISTIC2.0 facilitates sensitive and confident localization of the targets of focal somatic copy-number alteration in human cancers. *Genome Biol* 2011; 12: 1–14.
4. Edelmann J, Holzmann K, Miller F, et al. High-resolution genomic profiling of chronic lymphocytic leukemia reveals new recurrent genomic alterations. *Blood* 2012; 120: 4783–4794.
5. Mozas P, López C, Grau M, et al. Genomic landscape of follicular lymphoma across a wide spectrum of clinical behaviors. *Hematol Oncol* 2023. [Epub ahead of print] doi:10.1002/HON.3132.
6. Nadeu F, Delgado J, Royo C, et al. Clinical impact of clonal and subclonal TP53, SF3B1, BIRC3, NOTCH1, and ATM mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2016; 127: 2122–2130.
7. Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 2009; 25: 1754–1760.
8. Koboldt DC, Zhang Q, Larson DE, et al. VarScan 2: somatic mutation and copy number alteration discovery in cancer by exome sequencing. *Genome Res* 2012; 22: 568–576.
9. Wilm A, Aw PPK, Bertrand D, et al. LoFreq: a sequence-quality aware, ultra-sensitive variant caller for uncovering cell-population heterogeneity from high-throughput sequencing datasets. *Nucleic Acids Res* 2012; 40: 11189–11201.
10. Muller E, Goardon N, Brault B, et al. OutLyzer: software for extracting low-allele-frequency tumor mutations from sequencing background noise in clinical practice. *Oncotarget* 2016; 7: 79485–79493.
11. Garrison E, Marth G. Haplotype-based variant detection from short-read sequencing. 2012. doi:10.48550/arxiv.1207.3907.
12. Puente XS, Beà S, Valdés-Mas R, et al. Non-coding recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature* 2015; 526: 519–524.
13. Karube K, Enjuanes A, Dlouhy I, et al. Integrating genomic alterations in diffuse large B-cell lymphoma identifies new relevant pathways and potential therapeutic targets. *Leukemia* 2018; 32: 675–684.

14. Schmitz R, Wright GW, Huang DW, et al. Genetics and Pathogenesis of Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *New England Journal of Medicine* 2018; 378: 1396–1407.

V. DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

Los linfomas de células grandes B son un grupo heterogéneo de neoplasias con gran diversidad genética y un amplio espectro de presentaciones clínicas. En los últimos años, el conocimiento sobre las alteraciones genéticas subyacentes ha aumentado sustancialmente. Esto ha permitido refinar la clasificación de los linfomas y, además, identificar subtipos moleculares que agrupan a los pacientes según los mecanismos comunes de linfomagénesis. De igual forma, la identificación de subgrupos de pacientes con un alto riesgo de fracaso al tratamiento y la optimización de la selección de tratamientos dirigidos se han convertido en el núcleo de la investigación en los últimos años en los síndromes linfoproliferativos¹⁹⁷.

El análisis de las alteraciones genéticas en los linfomas requiere la obtención de biopsias tisulares, un proceso invasivo que puede verse limitado por el sitio anatómico del tumor (como el SNC, mediastino o retroperitoneo) o por errores de muestreo, lo que puede conllevar a no capturar la heterogeneidad espacial del tumor o la evolución clonal emergente tras el tratamiento. En ese sentido, la biopsia líquida y particularmente el uso del ctDNA, se ha incorporado como una herramienta útil en el diagnóstico, pronóstico, evaluación de la respuesta al tratamiento y el seguimiento de los pacientes con linfomas agresivos^{165,167,177,191,197}.

Si bien estudios previos han sentado las bases para para la aplicación clínica del ctDNA, todavía quedan preguntas críticas por resolver en cuanto a la metodología de los diferentes ensayos disponibles¹⁹⁷. Uno de los mayores obstáculos para la implementación del ctDNA en la rutina clínica es la falta de consistencia entre los diferentes protocolos de extracción. Varios estudios han demostrado que las condiciones de almacenamiento y los procedimientos de extracción están asociados con una amplia variación en la cantidad e integridad del ctDNA, lo que sugiere la necesidad de estandarizar el procedimiento preanalítico^{141,142,144,146,154}. En 2020, el *National Cancer Institute* de Estados Unidos estableció el primer consenso para la recolección y procesamiento de

muestras destinadas al análisis del cfDNA, representando el primer gran esfuerzo colaborativo para lograr este objetivo¹⁴³.

Recientemente, el desarrollo de nuevas estrategias de secuenciación basadas en NGS ha permitido mejorar la sensibilidad analítica hasta un límite de detección analítico de ~0.00005%. Una de estas estrategias es el PhasED-seq (*Phased Variant Enrichment and Detection Sequencing*), que utiliza el seguimiento de dos o más variantes ('variantes en fase') en la misma hebra de una sola molécula de ADN. Según Kurtz et al.¹⁶⁹, esta técnica logró detectar enfermedad residual en hasta un 25% de los pacientes con LDCGB que presentaban niveles de ctDNA indetectable después de dos ciclos de tratamiento mediante CAPP-seq. La detección de enfermedad residual mediante PhasED-seq se asoció con un peor pronóstico, lo que resalta la importancia de mejorar la sensibilidad de las técnicas de detección de ctDNA para una mejor evaluación de la respuesta al tratamiento y el pronóstico de los pacientes con LDCGB.

En los primeros dos trabajos utilizamos el ctDNA como fuente para la caracterización genética de la enfermedad. En el primero, incluimos de forma prospectiva a 79 pacientes diagnosticados con LDCGB en nuestra institución y en el segundo, de manera retrospectiva, a 18 pacientes con LPM en colaboración con el Hospital del Mar. En ambos trabajos, pudimos detectar al menos una mutación en plasma en el 87-90% de los casos, lo que coincide con lo previamente publicado, donde las tasas de detección variaban entre el 63% y el 85%^{177,194,198}. El perfil mutacional descrito en las muestras de ctDNA en ambos trabajos fueron muy consistente con lo publicado previamente en diferentes series de LDCGB y LPM, incluida una cohorte de nuestra institución^{20,96,97,177,199}.

También buscamos determinar la sensibilidad de la técnica comparando la información obtenida en plasma con la información de la biopsia tisular. En el LDCGB, la sensibilidad de ctDNA para detectar mutaciones presentes en las muestras emparejadas de FFPE fue del 68%, aumentando al 71% si solo se consideraba el número de genes mutados, en lugar del número total de mutaciones. En un estudio similar, Rossi et al.¹⁷⁷, determinaron el perfil genético de 50 pacientes con LDCGB utilizando ctDNA, detectando en plasma el 83% de

las mutaciones observadas en la biopsia tisular de 18 casos emparejados. Esta pequeña diferencia puede explicarse por la menor cobertura de secuenciación de nuestra serie (*mean coverage* de 329x en comparación con >1000x en el estudio de Rossi et al.) junto con un número sustancialmente mayor de genes incluidos en el diseño de nuestro panel (112 frente a 59 genes). En este sentido, la mayoría de las mutaciones de la biopsia que no se detectaron mediante el ctDNA tenían una baja frecuencia alélica en el tejido, lo que sugiere que podrían estar presentes por debajo del límite de detección en el ctDNA debido a la baja profundidad de secuenciación. Al considerar solo las mutaciones con una frecuencia alélica >20% en la biopsia del tumor, el porcentaje de mutaciones detectadas en el plasma aumentó hasta el 77%. Por otro lado, la sensibilidad del ctDNA para detectar las mutaciones fue significativamente menor en pacientes con enfermedad localizada. En los pacientes con LPM, la sensibilidad del ctDNA fue del 69%, logrando detectar >80% de las mutaciones en 7 de los 9 casos con muestra tisular disponible. En los 2 casos restantes, el número de mutaciones identificadas en el ctDNA fue menor que el observado en la muestra de FFPE, correspondiendo a pacientes con enfermedad localizada (estadio I de Ann Arbor).

Recientemente, se ha propuesto un nuevo algoritmo, denominado LymphGen, capaz de clasificar hasta el 63.1% de los casos de LDCGB en diferentes subgrupos moleculares²². Al aplicar este algoritmo a las mutaciones identificadas en el ctDNA, pudimos clasificar el 43% de nuestros casos, lo que proporciona evidencia para utilizar el ctDNA como fuente de clasificación molecular. El menor porcentaje de casos clasificados en nuestra serie podría explicarse por el menor número de genes estudiados junto con la falta de información sobre CNA. Precisamente, en el segundo trabajamos integramos el análisis de CNA a partir de ctDNA mediante WGS en dos casos de LPM, observando una concordancia del 75% con las alteraciones detectadas por OncoScan. La sensibilidad del WGS fue notablemente más alta para las alteraciones clonales (18/20, 90%) en comparación con las subclonales. Estos resultados demuestran la viabilidad de usar WGS para detectar CNA en ctDNA y estimar la fracción tumoral en el plasma de pacientes con LPM. Anteriormente, el low-pass-WGS se ha utilizado

para estudiar CNA en ctDNA en múltiples tipos de cáncer, como cáncer de pulmón, ovario, próstata y neuroblastoma, siendo concordantes con las alteraciones detectadas en el ADN de tejido tumoral. Por tanto, se considera que la detección de CNA en ctDNA podría ser un recurso valioso para identificar nuevas CNA como biomarcadores pronósticos en el futuro²⁰⁰.

Se ha propuesto que los subtipos genéticos de LDCGB difieren notablemente en su respuesta al tratamiento, especialmente a las nuevas terapias dirigidas. En los últimos años, se han combinado diferentes agentes con la inmunoterapia estándar sin lograr mejorar la respuesta ni la supervivencia global, aunque para ello sólo se ha tenido en cuenta la clasificación por la COO^{53,54,58}. En el ensayo PHOENIX⁵⁴, se evaluó la adición de ibrutinib a R-CHOP en pacientes con LDCGB no centrogerminal, y se analizaron posteriormente las biopsias de los pacientes para establecer los subtipos genéticos. Los resultados demostraron que la supervivencia libre de eventos a 3 años fue del 100% en el grupo ≤ 60 años de los subtipos MCD y N1 tratados con ibrutinib más R-CHOP, mientras que en los pacientes tratados únicamente con R-CHOP, la supervivencia fue significativamente inferior (42.9% y 50%, respectivamente, $P < 0.02$)⁵⁵. Estos hallazgos destacan la importancia de considerar la clasificación molecular en la toma de decisiones terapéuticas y apoyan el uso de terapias dirigidas específicas para subtipos genéticos particulares de LDCGB.

Además, la reciente integración de los anticuerpos monoclonales biespecíficos y la terapia de células CAR-T han hecho evidente la necesidad urgente de identificar biomarcadores predictivos que permita una selección racional de las terapias más efectivas en la práctica clínica futura. Recientemente, Frank et al²⁰¹ determinaron los niveles de ctDNA en 69 pacientes con LDCGB R/R que recibieron terapia con células CAR-T, demostrando que los niveles basales de ctDNA se correlacionan significativamente con la SLP y SG.

Otra característica crucial del ctDNA como biomarcador no invasivo es el reflejo preciso de la carga tumoral en el momento del diagnóstico, ya que esta se ha asociado a una peor respuesta al tratamiento y un peor pronóstico. En el primer trabajo hemos observado que los niveles basales de ctDNA están

significativamente asociados con parámetros clínicos bien descritos de carga tumoral, incluyendo los niveles de LDH y β 2-microglobulina, el IPI y el estadio avanzado, que no estaban claramente asociados en series previas^{167,177,194}. Kurtz *et al*¹⁶⁵ demostraron que los niveles elevados de ctDNA previos al inicio de tratamiento se relacionaban de forma independiente con un peor pronóstico, tanto después de la terapia de primera línea como de rescate. Usando el mismo punto de corte, 2.5 log hGE/mL, observamos que los pacientes con niveles elevados de ctDNA tenían una SLP a los 24 meses (65% frente a 85%; $P=0.038$) y tasas de SG significativamente inferiores (73% frente a 100%; $P=0.007$) en comparación con aquellos pacientes con niveles bajos, siendo esta la primera confirmación de este hallazgo en una serie prospectiva más amplia de un solo centro. Posteriormente, nuestros hallazgos fueron validados por otro grupo que evaluó el papel pronóstico del ctDNA en una serie de 112 pacientes con LDCGB tratados con R-CHOP, detectando ctDNA en 95 pacientes (84%) con una concentración media de 3.15 log hGE/mL, observando que aquellos pacientes con una concentración alta de ctDNA (>3.57 log hGE/mL) tenían una SLP a 12 meses inferior (44% frente a 83%, $P < 0.001$)²⁰².

En los últimos años, se ha demostrado el valor pronóstico del PET-CT en diferentes subtipos de linfoma, especialmente mediante la evaluación cuantitativa del VMT y la GTL³⁸. En nuestra cohorte de pacientes con LDCGB, hemos confirmado el valor pronóstico de ambos factores y observamos una correlación significativa entre los niveles basales de ctDNA y el VMT ($R = 0.56$; $P < 0.001$), lo que sugiere que los niveles de ctDNA reflejan adecuadamente la carga tumoral. Sin embargo, el análisis multivariado mostró que solo el VMT, pero no el ctDNA, retuvo su impacto pronóstico independiente en la SLP. En la serie de LPM, no encontramos una correlación significativa entre la cantidad de ctDNA y el pronóstico, posiblemente debido al tamaño muestral limitado.

El valor del VMT depende de manera crucial del método de segmentación, y actualmente no hay un consenso sobre cuál es el mejor método³². Aunque la mediana del VMT en nuestra cohorte fue menor en comparación con estudios previamente publicados^{32,39}, es importante tener en cuenta que Mikhaeel *et al.*³⁹ analizaron el valor pronóstico del VMT en una cohorte de 147 pacientes con

LDCGB tratados con R-CHOP en una sola institución utilizando el mismo método de segmentación. Sin embargo, en su cohorte el 40% de los pacientes presentaban enfermedad voluminosa en el momento del diagnóstico y el 68% de los pacientes tenían enfermedad diseminada (estadios III-IV), lo que podría explicar las diferencias en los resultados obtenidos.

Se ha propuesto recientemente un nuevo índice pronóstico, denominado IMPI (*International Metabolic Prognostic Index*), que ha sido desarrollado a partir del análisis de los estudios PET de 5 ensayos clínicos. Este índice combina el VMT con la edad (como variable continua) y el estadio Ann Arbor, y divide a los pacientes en tres grupos según la respuesta clínica esperada. El grupo de alto riesgo (10%) se corresponde con la incidencia de enfermedad primariamente refractaria, el grupo de riesgo intermedio (30%) se corresponde con la recaída después de la respuesta inicial y el grupo de bajo riesgo (60%) se corresponde con los pacientes que presentan una remisión completa mantenida en el tiempo. Según este modelo, la supervivencia global a tres años para cada grupo fue del 52%, 75% y 90%, respectivamente. El modelo IMPI puede utilizarse para estimar la probabilidad de riesgo del paciente mediante una fórmula de regresión y una calculadora para la SLP que ha sido desarrollada por los autores²⁰³.

Actualmente, las herramientas de pronóstico para el linfoma se basan principalmente en las características previas al tratamiento y no incorporan la información que surge durante el tratamiento, como puede ser la evolución clonal que experimentan las células tumorales durante y después del tratamiento que no se detecta fácilmente con las herramientas clínicas disponibles. El diseño y validación de índices pronósticos dinámicos es esencial para detectar de forma temprana aquellos pacientes que serán refractarios o la detección de clones resistentes al tratamiento. Ejemplo de ello es el modelo desarrollado por Kurtz y colaboradores¹⁸², CIRI (*Continuous Individualized Risk Index*), que combina la información determinada previo al inicio del tratamiento, la cual se actualiza a lo largo del tiempo a medida que se obtiene nuevos datos a través de la monitorización molecular mediante el uso de ctDNA y de la respuesta por imagen mediante PET. Aunque este índice fue probado en una serie de validación independiente, la prueba definitiva vendrá con los estudios clínicos prospectivos

en los que los pacientes sean monitorizados prospectivamente con una predicción en tiempo real, permitiendo tomar decisiones terapéuticas dentro del marco de la medicina personalizada.

La determinación seriada del ctDNA después de la terapia puede ser una estrategia de vigilancia mínimamente invasiva para identificar recaídas asintomáticas y caracterizar la resistencia adquirida y la evolución clonal. A diferencia de la monitorización con TAC tras el tratamiento, que no ha demostrado mejorar los resultados clínicos ni ser rentable cuando se aplica a todos los pacientes en la primera remisión completa^{204,205}. La detección temprana de la recaída de la enfermedad es cada vez más relevante ya que se ha demostrado que tanto la quimioterapia como la inmunoterapia son más eficaces en pacientes con baja carga tumoral^{161,206}.

En muchos casos, la aparición de nuevos subclones con el tiempo refleja un proceso de selección clonal bajo la presión del tratamiento, especialmente con agentes dirigidos. Varios estudios han revelado que los mecanismos moleculares de resistencia en el linfoma se pueden detectar de forma no invasiva mediante el uso de ctDNA. Por ejemplo, Agarwal y colaboradores¹⁸⁹ demostraron la aparición de mutaciones en el plasma de pacientes con LCM que conferían resistencia al tratamiento con ibrutinib más venetoclax dentro de un ensayo clínico, incluyendo la pérdida del cromosoma 9p21.1-p23.4 y mutaciones en el complejo SWI-SNF. Más recientemente, Sworder et al. observaron la aparición de mutaciones en *CD19*, *PAX5* y *TP53* en pacientes con LDCGB en recaída tratados con células CAR-T¹⁹².

Con todo ello, el ctDNA es un potencial biomarcador en los diferentes subtipos de linfoma, pero aún se necesitan más validaciones prospectivas en ensayos clínicos, así como un consenso para la estandarización y armonización del procesamiento de las muestras, de la cantidad mínima de genes a determinar para poder llevar a cabo el genotipado de los tumores de manera efectiva entre los distintos subtipos de linfoma.

Además, es esencial el desarrollo de kits comerciales que permitan llevar a cabo el estudio de la enfermedad residual para poder trasladar finalmente la utilización

del ctDNA a la práctica clínica habitual en el tratamiento de los pacientes con linfoma.

En la última edición de la clasificación de la OMS, se ha categorizado el TLBCL como una entidad diferente al LDCGB, reconociendo las características biológicas comunes entre los tumores primarios que se originan en el SNC, el compartimento vitreoretiniano y el testicular en pacientes inmunocompetentes, bajo el término de "linfomas de células B grandes de sitios inmunoprivilegiados" (barrera hematoencefálica, hematorretiniana y hematotesticular)⁴. Además, en la ICC también se ha reconocido el TLBCL como una entidad diferente al LDCGB, bajo el término de LDCGB primario testicular ⁵.

En el tercer trabajo, analizamos las características clínicas y biológicas de 61 casos de TLBCL tratados en la era de rituximab y comparamos su perfil genético con dos series previamente publicadas de LDCGB y PCNSL. Una característica distintiva de nuestro estudio con respecto a estudios previos es el mayor tamaño muestral (42 pacientes con análisis genómico), así como por la integración de resultados de NGS y CNA, con un número sustancialmente mayor de genes analizados (115 genes). Sin embargo, una posible limitación de nuestro estudio es que no se utilizaron métodos de secuenciación de exoma o genoma completos, lo que habría permitido la evaluación de genes que no están incluidos en nuestro diseño de panel.

En nuestra cohorte, el 30% de los pacientes presentaban enfermedad sistémica al diagnóstico, similar a lo reportado en estudios previos. Al comparar la complejidad genética del TLBCL sistémico, encontramos que se parece más al TLBCL localizado que al LDCGB nodal. Este hallazgo está en línea con un estudio reciente que encontró pocas diferencias genéticas al comparar el TLBCL en estadio I con aquellos en estadios II-IV, observando una mayor frecuencia de mutaciones de *BTG2* en los casos en estadio I y de *CD58* en los casos en estadio II- IV²⁰⁷.

Además, se confirmó que la mayoría de los casos de TLBCL presentan un fenotipo no GCB, ya que solo el 17% de las muestras fueron clasificadas como fenotipo GCB mediante IHC y Lymph2Cx. Esta observación es consistente con

los datos publicados en la literatura, donde se reporta que el fenotipo ABC/no GCB representa del 69 al 96% de los casos de TLBCL^{109,118–120}.

Mediante un análisis genómico exhaustivo identificamos el perfil genético de TLBCL, el cual se caracteriza por alteraciones en genes implicados en la activación de BCR (*CD79B*, *SGK1*), señalización del TLR (*MYD88*), vía NF-κB (*PIM1*, *TNFAIP3*), inestabilidad genómica o control del ciclo celular (*CDKN2A/B*), evasión inmune (*HLA-C* y *HLA-B*), diferenciación de células B (*PRDM1*) y moduladores epigenéticos (*ARID1B*).

En la reciente clasificación molecular propuesta para el LDCGB, se ha observado que la mayoría de los TLBCL se agrupan en los grupos MCD/C5/MYD88, los cuales están enriquecidos en mutaciones *MYD88* y *CD79B*^{20,22,208}. Al aplicar el algoritmo LymphGen a nuestra serie, el grupo MCD fue el más frecuente (66% de los casos), presentando una frecuencia significativamente mayor de mutaciones *MYD88*^{L265P} y *CD79B* en comparación con el LDCGB nodal (57% frente a 13% y 50% frente a 10%, respectivamente, $P < 0.01$), lo cual concuerda con otras series publicadas^{121,123}. Estas mutaciones, que afectan la señalización de TLR y la activación de BCR, son características distintivas del LDCGB extranodal^{209–212}.

Además, las mutaciones en genes que participan en la vigilancia inmunológica son fundamentales para la patogénesis del TLBCL, incluyendo las pérdidas de los loci de HLA de clase I y II, lo cual se asocia con una expresión reducida. En nuestra serie, detectamos pérdidas de 6p21 (*HLA*) en el 15% de los casos, y se perdió la expresión de MHC I y MHC II en el 91% y el 62% de los casos, respectivamente. Otros mecanismos de evasión inmune descritos en el TLBCL son las ganancias, translocaciones y deleciones de 9p24.1 (*PD-L1/PD-L2*) y de 15q21 que afectan al gen *B2M*. Aunque Chapuy et al.¹²³ reportaron ganancias de PD-L1 y/o PD-L2 en la mitad de los casos de TLBCL, este hallazgo no fue corroborado en otro estudio reciente ni en nuestra propia serie¹²².

El perfil genético del TLBCL muestra algunas similitudes con el LDCGBnodal, pero también presenta características distintivas. La inestabilidad genética en el TLBCL está mediada por la pérdida de *CDKN2A/B*, mientras que el LDCGBnodal generalmente se caracteriza por pérdidas de 13q14 (*RB1*), ganancias de 8q24

(*MYC*) o alteraciones de *TP53*^{123,213,214}. Una observación destacable fue la marcada ocurrencia de mutaciones en *TBL1XR1* y *MEF2B* en el TLBCL en comparación con el DLBCL. Consistente con lo previamente descrito en el PCNSL²⁰⁹, observamos una ocurrencia simultánea de mutaciones en *MYD88*^{L265P} y *TBL1XR* en el 86% (12/14) de los casos. Finalmente, las alteraciones en *ETV6* también fueron más prevalentes en el TLBCL en comparación con el DLBCL, similar a lo descrito en el PCNSL, corroborando el perfil genómico similar de ambos LDCGB extranodales^{123,215,216}. En comparación con el PCNSL, el TLBCL no mostró diferencias importantes en cuanto a CNA o perfil mutacional.

En este estudio, debido al número limitado de casos, fue difícil encontrar correlaciones significativas con el pronóstico. Sin embargo, se observó que los pacientes con alteraciones en los genes *ATM* y *SPEN* tuvieron una menor SLP. *ATM* es un regulador clave de la respuesta al daño del ADN y se ha descubierto que está frecuentemente mutado en neoplasias de células B, lo que se asocia con una complejidad genómica estructural y un impacto negativo en la evolución de los pacientes^{217,218}. Las alteraciones de *SPEN*, un gen que codifica un represor transcripcional inducible por hormonas, también se han asociado con una menor supervivencia libre de progresión en linfomas²¹⁹.

En los últimos años, se han hecho avances significativos en el tratamiento del TLBCL con la incorporación de rituximab y radioterapia. Aunque el régimen R-CHOP cada 21 días con metotrexato intratecal y radioterapia locorregional sigue siendo el estándar de tratamiento, todavía existe una necesidad médica no satisfecha para pacientes que no responden a este enfoque. Una mayor comprensión de los procesos fisiopatológicos del TLBCL tiene el potencial de mejorar aún más el tratamiento de este subtipo de linfoma.

VI. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. El DNA circulante tumoral es una fuente no invasiva para la caracterización genética del linfoma difuso de células grandes B y el linfoma de células B primario de mediastino, especialmente útil cuando la accesibilidad a muestras tisulares es limitada.
2. El perfil mutacional y las alteraciones en el número de copias, determinados mediante el uso de ctDNA, presentan una buena correlación con los determinados en la biopsia tisular.
3. El DNA circulante tumoral permite evaluar la heterogeneidad tumoral, así como establecer la clasificación molecular de los linfomas, lo que representa una oportunidad para la selección de terapias dirigidas.
4. Los niveles basales de DNA circulante tumoral tienen un impacto pronóstico en la respuesta y la supervivencia de los pacientes con linfoma difuso de células grandes B y se correlacionan con otras variables de carga tumoral como el volumen metabólico tumoral.
5. La mayoría de los casos de linfoma testicular de células grandes B pertenecen al subtipo de célula activada y se clasifican dentro del grupo MCD.
6. El linfoma testicular de células grandes B sistémico presenta muy pocas diferencias genéticas en comparación con el localizado.
7. El linfoma difuso de células grandes B primario del sistema nervioso central y el linfoma testicular de células grandes B comparten un perfil mutacional similar. Este último presenta una mayor frecuencia de alteraciones genéticas en las vías de señalización de BCR, NF- κ B y Toll-like receptor respecto al linfoma difuso de células grandes B nodal.

8. Estas alteraciones genéticas confirieron al linfoma testicular de células grandes B un perfil distintivo que apoya su reconocimiento como una entidad diferente del linfoma difuso de células grandes B.

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Revised Fourth Edition. International Agency for Research on Cancer (IARC): Lyon, France, 2017.
2. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* 2021; 71: 209–249.
3. Bastos-Oreiro M, Muntañola A, Panizo C, Gonzalez-Barca E, de Villambrosia SG, Córdoba R et al. RELINF: prospective epidemiological registry of lymphoid neoplasms in Spain. A project from the GELTAMO group. *Ann Hematol* 2020; 99: 799–808.
4. Alaggio R, Amador C, Anagnostopoulos I, Attygalle AD, Araujo IB de O, Berti E et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Lymphoid Neoplasms. *Leukemia* 2022; 36: 1720–1748.
5. Campo E, Jaffe ES, Cook JR, Quintanilla-Martinez L, Swerdlow SH, Anderson KC et al. The International Consensus Classification of Mature Lymphoid Neoplasms: a report from the Clinical Advisory Committee. *Blood* 2022; 140: 1229–1253.
6. Sehn LH, Salles G. Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med* 2021; 384: 842–858.
7. Susanibar-Adaniya S, Barta SK. 2021 Update on Diffuse large B cell lymphoma: A review of current data and potential applications on risk stratification and management. *Am J Hematol* 2021; 96: 617.
8. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 2000; 403: 503–511.
9. Scott DW, Wright GW, Williams PM, Lih C-J, Walsh W, Jaffe ES et al. Determining cell-of-origin subtypes of diffuse large B-cell lymphoma using gene expression in formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *Blood* 2014; 123: 1214–1217.
10. Gutiérrez-García G, Cardesa-Salzmänn T, Climent F, González-Barca E, Mercadal S, Mate JL et al. Gene-expression profiling and not immunophenotypic algorithms predicts prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with immunochemotherapy. *Blood* 2011; 117: 4836–4843.
11. Lenz G, Wright G, Dave SS, Xiao W, Powell J, Zhao H et al. Stromal gene signatures in large-B-cell lymphomas. *N Engl J Med* 2008; 359: 2313–2323.
12. Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, Gascoyne RD, Delabie J, Ott G et al. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood* 2004; 103: 275–282.
13. Rosenwald A, Bens S, Advani R, Barrans S, Copie-Bergman C, Elsensohn MH et al. Prognostic significance of MYC rearrangement and translocation

- partner in diffuse large B-cell lymphoma: A study by the Lunenburg Lymphoma Biomarker Consortium. *J Clin Oncol* 2019; 37: 3359–3368.
14. Valera A, López-Guillermo A, Cardesa-Salzmann T, Climent F, González-Barca E, Mercadal S et al. MYC protein expression and genetic alterations have prognostic impact in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with immunochemotherapy. *Haematologica* 2013; 98: 1554–1562.
 15. Petrich AM, Gandhi M, Jovanovic B, Castillo JJ, Rajguru S, Yang DT et al. Impact of induction regimen and stem cell transplantation on outcomes in double-hit lymphoma: a multicenter retrospective analysis. *Blood* 2014; 124: 2354–2361.
 16. Ennishi D, Jiang A, Boyle M, Collinge B, Grande BM, Ben-Neriah S et al. Double-Hit Gene Expression Signature Defines a Distinct Subgroup of Germinal Center B-Cell-Like Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *J Clin Oncol* 2019; 37: 190–201.
 17. Hilton LK, Tang J, Ben-Neriah S, Alcaide M, Jiang A, Grande BM et al. The double-hit signature identifies double-hit diffuse large B-cell lymphoma with genetic events cryptic to FISH. *Blood* 2019; 134: 1528–1532.
 18. Hwang J, Suh CH, Kim KW, Kim HS, Kim AI, Craig JW et al. The Incidence and Treatment Response of Double Expression of MYC and BCL2 in Patients with Diffuse Large B-Cell Lymphoma: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Cancers* 2021; 13: 3369.
 19. Staiger AM, Ziepert M, Horn H, Scott DW, Barth TFE, Bernd HW et al. Clinical impact of the cell-of-origin classification and the MYC/BCL2 dual expresser status in diffuse large B-cell lymphoma treated within prospective clinical trials of the German high-grade non-Hodgkin's lymphoma study group. *J Clin Oncol* 2017; 35: 2515–2526.
 20. Chapuy B, Stewart C, Dunford AJ, Kim J, Kamburov A, Redd RA et al. Molecular subtypes of diffuse large B cell lymphoma are associated with distinct pathogenic mechanisms and outcomes. *Nat Med* 2018; 24: 679–690.
 21. Schmitz R, Wright GW, Huang DW, Johnson CA, Phelan JD, Wang JQ et al. Genetics and Pathogenesis of Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med* 2018; 378: 1396–1407.
 22. Wright GW, Huang DW, Phelan JD, Coulibaly ZA, Roulland S, Young RM et al. A Probabilistic Classification Tool for Genetic Subtypes of Diffuse Large B Cell Lymphoma with Therapeutic Implications. *Cancer Cell* 2020; 37: 551-568.e14.
 23. Morin RD, Arthur SE, Hodson DJ. Molecular profiling in diffuse large B-cell lymphoma: why so many types of subtypes? *Br J Haematol* 2022; 196: 814–829.
 24. A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 1993; 329: 987–994.
 25. Ruppert AS, Dixon JG, Salles G, Wall A, Cunningham D, Poeschel V et al. International prognostic indices in diffuse large B-cell lymphoma: a comparison of IPI, R-IPI, and NCCN-IPI. *Blood* 2020; 135: 2041–2048.
 26. Ziepert M, Hasenclever D, Kuhnt E, Glass B, Schmitz N, Pfreundschuh M et al. Standard International prognostic index remains a valid predictor of

- outcome for patients with aggressive CD20+ B-cell lymphoma in the rituximab era. *J Clin Oncol* 2010; 28: 2373–2380.
27. Sehn LH, Berry B, Chhanabhai M, Fitzgerald C, Gill K, Hoskins P et al. The revised International Prognostic Index (R-IPI) is a better predictor of outcome than the standard IPI for patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *Blood* 2007; 109: 1857–1861.
 28. Zhou Z, Sehn LH, Rademaker AW, Gordon LI, LaCasce AS, Crosby-Thompson A et al. An enhanced International Prognostic Index (NCCN-IPI) for patients with diffuse large B-cell lymphoma treated in the rituximab era. *Blood* 2014; 123: 837–842.
 29. Montalbán C, Díaz-López A, Dlouhy I, Rovira J, Lopez-Guillermo A, Alonso S et al. Validation of the NCCN-IPI for diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL): the addition of $\beta 2$ -microglobulin yields a more accurate GELTAMO-IPI. *Br J Haematol* 2017; 176: 918–928.
 30. Meignan M, Gallamini A, Haioun C. Report on the First International Workshop on interim-PET scan in lymphoma. *Leuk Lymphoma*. 2009;50:1257-1260.
 31. Guzmán Ortiz S, Mucientes Rasilla J, Vargas Núñez JA, Royuela A, Navarro Matilla B, Mitjavila Casanovas M. Evaluation of the prognostic value of different methods of calculating the tumour metabolic volume with 18F-FDG PET/CT, in patients with diffuse large cell B-cell lymphoma. *Rev Esp Med Nucl Imagen Mol* 2020;39:340-346
 32. Ilyas H, Mikhaeel NG, Dunn JT, Rahman F, Møller H, Smith D et al. Defining the optimal method for measuring baseline metabolic tumour volume in diffuse large B cell lymphoma. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2018; 45: 1142–1154.
 33. El-Galaly TC, Villa D, Cheah CY, Gormsen LC. Pre-treatment total metabolic tumour volumes in lymphoma: Does quantity matter? *Br J Haematol* 2022; 197: 139–155.
 34. Jakobsen LH, Bøgsted M, Brown PDN, Arboe B, Jørgensen J, Larsen TS et al. Minimal Loss of Lifetime for Patients With Diffuse Large B-Cell Lymphoma in Remission and Event Free 24 Months After Treatment: A Danish Population-Based Study. *J Clin Oncol* 2017; 35: 778–784.
 35. Song MK, Chung JS, Shin HJ, Lee SM, Lee SE, Lee HS et al. Clinical significance of metabolic tumor volume by PET/CT in stages II and III of diffuse large B cell lymphoma without extranodal site involvement. *Ann Hematol* 2012; 91: 697–703.
 36. Sasanelli M, Meignan M, Haioun C, Berriolo-Riedinger A, Casasnovas RO, Biggi A et al. Pretherapy metabolic tumour volume is an independent predictor of outcome in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2014; 41: 2017–2022.
 37. Song MK, Yang DH, Lee GW, Lim SN, Shin S, Pak KJ et al. High total metabolic tumor volume in PET/CT predicts worse prognosis in diffuse large B cell lymphoma patients with bone marrow involvement in rituximab era. *Leuk Res* 2016; 42: 1–6.
 38. Cottreau AS, Lanic H, Mareschal S, Meignan M, Vera P, Tilly H et al. Molecular profile and FDG-PET/CT Total metabolic tumor volume improve

- risk classification at diagnosis for patients with diffuse large B-Cell lymphoma. *Clin Cancer Res* 2016; 22: 3801–3809.
39. Mikhaeel NG, Smith D, Dunn JT, Phillips M, Møller H, Fields PA et al. Combination of baseline metabolic tumour volume and early response on PET/CT improves progression-free survival prediction in DLBCL. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2016; 43: 1209–1219.
 40. Vercellino L, Cottreau AS, Casasnovas O, Tilly H, Feugier P, Chartier L et al. High total metabolic tumor volume at baseline predicts survival independent of response to therapy. *Blood* 2020; 135: 1396–1405.
 41. Kostakoglu L, Mattiello F, Martelli M, Sehn LH, Belada D, Ghiggi C et al. Total metabolic tumor volume as a survival predictor for patients with diffuse large B-cell lymphoma in the GOYA study. *Haematologica* 2022;107:1633-1642.
 42. Schmitz C, Hüttmann A, Müller SP, Hanoun M, Boellaard R, Brinkmann M et al. Dynamic risk assessment based on positron emission tomography scanning in diffuse large B-cell lymphoma: Post-hoc analysis from the PETAL trial. *Eur J Cancer* 2020; 124: 25–36.
 43. Cunningham D, Hawkes EA, Jack A, Qian W, Smith P, Mouncey P et al. Rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisolone in patients with newly diagnosed diffuse large B-cell non-Hodgkin lymphoma: a phase 3 comparison of dose intensification with 14-day versus 21-day cycles. *Lancet* 2013; 381: 1817–1826.
 44. Delarue R, Tilly H, Mounier N, Petrella T, Salles G, Thieblemont C et al. Dose-dense rituximab-CHOP compared with standard rituximab-CHOP in elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma (the LNH03-6B study): a randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2013; 14: 525–533.
 45. Stiff PJ, Unger JM, Cook JR, Constine LS, Couban S, Stewart DA et al. Autologous Transplantation as Consolidation for Aggressive Non-Hodgkin's Lymphoma. *N Engl J Med* 2013; 369: 1681–1690.
 46. Cortelazzo S, Tarella C, Gianni AM, Ladetto M, Barbui AM, Rossi A et al. Randomized Trial Comparing R-CHOP Versus High-Dose Sequential Chemotherapy in High-Risk Patients With Diffuse Large B-Cell Lymphomas. *J Clin Oncol* 2016; 34: 4015–4022.
 47. Vitolo U, Trneny M, Belada D, Burke JM, Carella AM, Chua N et al. Obinutuzumab or rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone in previously untreated diffuse large b-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 2017; 35: 3529–3537.
 48. Sehn LH, Martelli M, Trněný M, Liu W, Bolen CR, Knapp A et al. A randomized, open-label, Phase III study of obinutuzumab or rituximab plus CHOP in patients with previously untreated diffuse large B-Cell lymphoma: final analysis of GOYA. *J Hematol Oncol* 2020; 13. doi:10.1186/S13045-020-00900-7.
 49. Thieblemont C, Tilly H, Da Silva MG, Casasnovas RO, Fruchart C, Morschhauser F et al. Lenalidomide Maintenance Compared With Placebo in Responding Elderly Patients With Diffuse Large B-Cell Lymphoma Treated With First-Line Rituximab Plus Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine, and Prednisone. *J Clin Oncol* 2017; 35: 2473–2481.

50. Habermann TM, Weller EA, Morrison VA, Gascoyne RD, Cassileth PA, Cohn JB et al. Rituximab-CHOP versus CHOP alone or with maintenance rituximab in older patients with diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 2006; 24: 3121–3127.
51. Bartlett NL, Wilson WH, Jung SH, Hsi ED, Maurer MJ, Pederson LD et al. Dose-Adjusted EPOCH-R Compared With R-CHOP as Frontline Therapy for Diffuse Large B-Cell Lymphoma: Clinical Outcomes of the Phase III Intergroup Trial Alliance/CALGB 50303. *J Clin Oncol* 2019; 37: 1790–1799.
52. Récher C, Coiffier B, Haioun C, Molina TJ, Fermé C, Casasnovas O et al. Intensified chemotherapy with ACVBP plus rituximab versus standard CHOP plus rituximab for the treatment of diffuse large B-cell lymphoma (LNH03-2B): an open-label randomised phase 3 trial. *Lancet* 2011; 378: 1858–1867.
53. Davies A, Cummin TE, Barrans S, Maishman T, Mamot C, Novak U et al. Gene-expression profiling of bortezomib added to standard chemoimmunotherapy for diffuse large B-cell lymphoma (REMoDL-B): an open-label, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2019; 20: 649–662.
54. Younes A, Sehn LH, Johnson P, Zinzani PL, Hong X, Zhu J et al. Randomized phase III trial of ibrutinib and rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone in non-germinal center B-cell diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 2019; 37: 1285–1295.
55. Wilson WH, Wright GW, Huang DW, Hodgkinson B, Balasubramanian S, Fan Y et al. Effect of ibrutinib with R-CHOP chemotherapy in genetic subtypes of DLBCL. *Cancer Cell* 2021; 39: 1643-1653.e3.
56. Nowakowski GS, LaPlant B, Macon WR, Reeder CB, Foran JM, Nelson GD et al. Lenalidomide combined with R-CHOP overcomes negative prognostic impact of non-germinal center B-cell phenotype in newly diagnosed diffuse large B-cell lymphoma: A phase II study. *J Clin Oncol* 2015; 33: 251–257.
57. Vitolo U, Chiappella A, Franceschetti S, Carella AM, Baldi I, Inghirami G et al. Lenalidomide plus R-CHOP21 in elderly patients with untreated diffuse large B-cell lymphoma: results of the REAL07 open-label, multicentre, phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2014; 15: 730–737.
58. Nowakowski GS, Chiappella A, Gascoyne RD, Scott DW, Zhang Q, Jurczak W et al. ROBUST: A Phase III Study of Lenalidomide Plus R-CHOP Versus Placebo Plus R-CHOP in Previously Untreated Patients With ABC-Type Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *J Clin Oncol* 2021; 39: 1317–1328.
59. Morschhauser F, Feugier P, Flinn IW, Gasiorowski R, Greil R, Illés Á et al. A phase 2 study of venetoclax plus R-CHOP as first-line treatment for patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2021; 137: 600–609.
60. Westin J, Davis RE, Feng L, Hagemeister F, Steiner R, Lee HJ et al. Smart Start: Rituximab, Lenalidomide, and Ibrutinib in Patients With Newly Diagnosed Large B-Cell Lymphoma. *J Clin Oncol*. 2023;41:745-755.
61. Tilly H, Morschhauser F, Sehn LH, Friedberg JW, Trněný M, Sharman JP et al. Polatuzumab Vedotin in Previously Untreated Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med* 2022; 386: 351–363.

62. Stegemann M, Denker S, Schmitt CA. DLBCL 1L – What to Expect beyond R-CHOP? *Cancers* 2022; 14: 1453.
63. Topp MS, Tani M, Dickinson M, Ghosh N, Santoro A, Pinto A et al. Glofitamab Plus R-CHOP Induces High Response Rates and a Favorable Safety Profile in Patients with Previously Untreated Diffuse Large B-Cell Lymphoma (DLBCL): Results from a Phase Ib Study. *Blood* 2022; 140: 1775–1777.
64. Mounier N, El Gnaoui T, Tilly H, Canioni D, Sebban C, Casasnovas RO et al. Rituximab plus gemcitabine and oxaliplatin in patients with refractory/relapsed diffuse large B-cell lymphoma who are not candidates for high-dose therapy. A phase II Lymphoma Study Association trial. *Haematologica* 2013; 98: 1726–1731.
65. Frontzek F, Karsten I, Schmitz N, Lenz G. Current options and future perspectives in the treatment of patients with relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma. *Ther Adv Hematol* 2022; 13: 20406207221103320.
66. Sehn LH, Herrera AF, Flowers CR, Kamdar MK, McMillan A, Hertzberg M et al. Polatuzumab Vedotin in Relapsed or Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *J Clin Oncol* 2020; 38: 155–165.
67. Caimi PF, Ai W, Alderuccio JP, Ardeshtna KM, Hamadani M, Hess B et al. Loncastuximab tesirine in relapsed or refractory diffuse large B-cell lymphoma (LOTIS-2): a multicentre, open-label, single-arm, phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2021; 22: 790–800.
68. Duell J, Maddocks KJ, González-Barca E, Jurczak W, Liberati AM, de Vos S et al. Long-term outcomes from the Phase II L-MIND study of tafasitamab (MOR208) plus lenalidomide in patients with relapsed or refractory diffuse large B-cell lymphoma. *Haematologica* 2021; 106: 2417–2426.
69. Neelapu SS, Locke FL, Bartlett NL, Lekakis LJ, Miklos DB, Jacobson CA et al. Axicabtagene Ciloleucel CAR T-Cell Therapy in Refractory Large B-Cell Lymphoma. *Jd* 2017; 377: 2531–2544.
70. Locke FL, Ghobadi A, Jacobson CA, Miklos DB, Lekakis LJ, Oluwole OO et al. Long-term safety and activity of axicabtagene ciloleucel in refractory large B-cell lymphoma (ZUMA-1): a single-arm, multicentre, phase 1–2 trial. *Lancet Oncol* 2019; 20: 31–42.
71. Schuster SJ, Bishop MR, Tam CS, Waller EK, Borchmann P, McGuirk JP et al. Tisagenlecleucel in Adult Relapsed or Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med* 2019; 380: 45–56.
72. Schuster SJ, Tam CS, Borchmann P, Worel N, McGuirk JP, Holte H et al. Long-term clinical outcomes of tisagenlecleucel in patients with relapsed or refractory aggressive B-cell lymphomas (JULIET): a multicentre, open-label, single-arm, phase 2 study. *Lancet Oncol* 2021; 22: 1403–1415.
73. Abramson JS, Palomba ML, Gordon LI, Lunning MA, Wang M, Arnason J et al. Lisocabtagene maraleucel for patients with relapsed or refractory large B-cell lymphomas (TRANSCEND NHL 001): a multicentre seamless design study. *Lancet* 2020; 396: 839–852.
74. Vercellino L, Di Blasi R, Kanoun S, Tessoulin B, Rossi C, D’Aveni-Piney M et al. Predictive factors of early progression after CAR T-cell therapy in relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma. *Blood Adv* 2020; 4: 5607–5615.

75. Locke FL, Miklos DB, Jacobson CA, Perales M-A, Kersten M-J, Oluwole OO et al. Axicabtagene Ciloleucel as Second-Line Therapy for Large B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med* 2022; 386: 640–654.
76. Kamdar M, Solomon SR, Arnason J, Johnston PB, Glass B, Bachanova V et al. Lisocabtagene maraleucel versus standard of care with salvage chemotherapy followed by autologous stem cell transplantation as second-line treatment in patients with relapsed or refractory large B-cell lymphoma (TRANSFORM): results from an interim analysis of an open-label, randomised, phase 3 trial. *Lancet* 2022; 399: 2294–2308.
77. Bishop MR, Dickinson M, Purtill D, Barba P, Santoro A, Hamad N et al. Second-Line Tisagenlecleucel or Standard Care in Aggressive B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med* 2022; 386: 629–639.
78. Falchi L, Vardhana SA, Salles GA. Bispecific antibodies for the treatment of B-cell lymphoma: Promises, unknowns and opportunities. *Blood* 2023;141(5):467-480.
79. Dickinson MJ, Carlo-Stella C, Morschhauser F, Bachy E, Corradini P, Iacoboni G et al. Glofitamab for Relapsed or Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med* 2022; 387: 2220–2231.
80. Thieblemont C, Phillips T, Ghesquieres H, Cheah CY, Clausen MR, Cunningham D et al. Epcoritamab, a Novel, Subcutaneous CD3xCD20 Bispecific T-Cell-Engaging Antibody, in Relapsed or Refractory Large B-Cell Lymphoma: Dose Expansion in a Phase I/II Trial. *J Clin Oncol*. 2023;41:2238-2247.
81. Abrisqueta P, Cordoba R, Falchi L, de Vos S, Nijland M, Offner F et al. Subcutaneous Epcoritamab + R-Dhax/C in Patients with Relapsed or Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma Eligible for Autologous Stem Cell Transplant: Updated Phase 1/2 Results. *Blood* 2022; 140: 1068–1069.
82. Budde LE, Assouline S, Sehn LH, Schuster SJ, Yoon SS, Yoon DH et al. Single-Agent Mosunetuzumab Shows Durable Complete Responses in Patients with Relapsed or Refractory B-Cell Lymphomas: Phase I Dose-Escalation Study. *J Clin Oncol* 2022; 40: 481–491.
83. Kim W-S, Kim TM, Cho S-G, Jarque I, Iskierka-Jażdżewska E, Poon ML et al. Odronextamab in Patients with Relapsed/Refractory (R/R) Diffuse Large B-Cell Lymphoma (DLBCL): Results from a Prespecified Analysis of the Pivotal Phase II Study ELM-2. *Blood* 2022; 140: 1070–1071.
84. Olszewski AJ, Budde LE, Chavez J, Ghosh N, Kamdar M, Lossos IS et al. Mosunetuzumab with Polatuzumab Vedotin Is Effective and Has a Manageable Safety Profile in Patients Aged <65 and ≥65 Years with Relapsed/Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma (R/R DLBCL) and ≥1 Prior Therapy: Subgroup Analysis of a Phase Ib/II Study. *Blood* 2022; 140: 3757–3759.
85. Rosenwald A, Wright G, Leroy K, Yu X, Gaulard P, Gascoyne RD et al. Molecular diagnosis of primary mediastinal B cell lymphoma identifies a clinically favorable subgroup of diffuse large B cell lymphoma related to Hodgkin lymphoma. *J Exp Med* 2003; 198: 851–862.
86. Savage KJ. Primary mediastinal large B-cell lymphoma. *Blood* 2022; 140: 955–970.

87. Sun W, Song K, Zervos M, Pass H, Cangiarella J, Bizekis C et al. The diagnostic value of endobronchial ultrasound-guided needle biopsy in lung cancer and mediastinal adenopathy. *Diagn Cytopathol* 2010; 38: 337–342.
88. Ahmed Z, Afridi SS, Shahid Z, Zamani Z, Rehman S, Aiman W et al. Primary Mediastinal B-Cell Lymphoma: A 2021 Update on Genetics, Diagnosis, and Novel Therapeutics. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2021; 21: e865–e875.
89. Hamlin PA, Portlock CS, Straus DJ, Noy A, Singer A, Horwitz SM et al. Primary mediastinal large B-cell lymphoma: optimal therapy and prognostic factor analysis in 141 consecutive patients treated at memorial Sloan Kettering from 1980 to 1999. *Br J Haematol* 2005; 130: 691–699.
90. Aoki T, Izutsu K, Suzuki R, Nakaseko C, Arima H, Shimada K et al. Prognostic significance of pleural or pericardial effusion and the implication of optimal treatment in primary mediastinal large B-cell lymphoma: a multicenter retrospective study in Japan. *Haematologica* 2014; 99: 1817–1825.
91. Vassilakopoulos TP, Michail M, Papageorgiou S, Kourti G, Angelopoulou MK, Panitsas F et al. Identification of Very Low-Risk Subgroups of Patients with Primary Mediastinal Large B-Cell Lymphoma Treated with R-CHOP. *Oncologist* 2021; 26: 597–609.
92. Ceriani L, Milan L, Martelli M, Ferreri AJM, Cascione L, Zinzani PL et al. Metabolic heterogeneity on baseline 18FDG-PET/CT scan is a predictor of outcome in primary mediastinal B-cell lymphoma. *Blood* 2018; 132: 179–186.
93. Rosenwald A, Wright G, Leroy K, Yu X, Gaulard P, Gascoyne RD et al. Molecular diagnosis of primary mediastinal B cell lymphoma identifies a clinically favorable subgroup of diffuse large B cell lymphoma related to Hodgkin lymphoma. *J Exp Med* 2003; 198: 851–862.
94. Savage KJ, Monti S, Kutok JL, Cattoretto G, Neuberg D, De Leval L et al. The molecular signature of mediastinal large B-cell lymphoma differs from that of other diffuse large B-cell lymphomas and shares features with classical Hodgkin lymphoma. *Blood* 2003; 102: 3871–3879.
95. Mottok A, Wright G, Rosenwald A, Ott G, Ramsower C, Campo E et al. Molecular classification of primary mediastinal large B-cell lymphoma using routinely available tissue specimens. *Blood* 2018; 132: 2401–2405.
96. Mottok A, Hung SS, Chavez EA, Woolcock B, Telenius A, Chong LC et al. Integrative genomic analysis identifies key pathogenic mechanisms in primary mediastinal large B-cell lymphoma. *Blood* 2019; 134: 802–813.
97. Chapuy B, Stewart C, Dunford AJ, Kim J, Wienand K, Kamburov A et al. Genomic analyses of PMBL reveal new drivers and mechanisms of sensitivity to PD-1 blockade. *Blood* 2019; 134: 2369–2382.
98. Mottok A, Woolcock B, Chan FC, Tong KM, Chong L, Farinha P et al. Genomic Alterations in CIITA Are Frequent in Primary Mediastinal Large B Cell Lymphoma and Are Associated with Diminished MHC Class II Expression. *Cell Rep* 2015; 13: 1418–1431.
99. Lees C, Keane C, Gandhi MK, Gunawardana J. Biology and therapy of primary mediastinal B-cell lymphoma: current status and future directions. *Br J Haematol* 2019; 185: 25–41.

100. Rieger M, Österborg A, Pettengell R, White D, Gill D, Walewski J et al. Primary mediastinal B-cell lymphoma treated with CHOP-like chemotherapy with or without rituximab: results of the Mabthera International Trial Group study. *Ann Oncol* 2011; 22: 664–670.
101. Zinzani PL, Stefoni V, Finolezzi E, Brusamolino E, Cabras MG, Chiappella A et al. Rituximab combined with MACOP-B or VACOP-B and radiation therapy in primary mediastinal large B-cell lymphoma: a retrospective study. *Clin Lymphoma Myeloma* 2009; 9: 381–385.
102. Dunleavy K, Pittaluga S, Maeda LS, Advani R, Chen CC, Hessler J et al. Dose-adjusted EPOCH-rituximab therapy in primary mediastinal B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 2013; 368: 1408–1416.
103. Jackson MW, Rusthoven CG, Jones BL, Kamdar M, Rabinovitch R. Improved survival with combined modality therapy in the modern era for primary mediastinal B-cell lymphoma. *Am J Hematol* 2016; 91: 476–480.
104. Zinzani PL, Broccoli A, Casadei B, Stefoni V, Pellegrini C, Gandolfi L et al. The role of rituximab and positron emission tomography in the treatment of primary mediastinal large B-cell lymphoma: experience on 74 patients. *Hematol Oncol* 2015; 33: 145–150.
105. Hayden AR, Tonseth P, Lee DG, Villa D, Gerrie AS, Scott DW et al. Outcome of primary mediastinal large B-cell lymphoma using R-CHOP: impact of a PET-adapted approach. *Blood* 2020; 136: 2803–2811.
106. Kuruvilla J, Pintilie M, Tsang R, Nagy T, Keating A, Crump M. Salvage chemotherapy and autologous stem cell transplantation are inferior for relapsed or refractory primary mediastinal large B-cell lymphoma compared with diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2008; 49: 1329–1336.
107. Vardhana S, Hamlin PA, Yang J, Zelenetz A, Sauter CS, Matasar MJ et al. Outcomes of Relapsed and Refractory Primary Mediastinal (Thymic) Large B Cell Lymphoma Treated with Second-Line Therapy and Intent to Transplant. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2018;24:2133-2138.
108. Zinzani PL, Melnichenko V, Bouabdallah K, Walewski J, Majlis A, Fogliatto L et al. Pembrolizumab Monotherapy in Relapsed or Refractory Primary Mediastinal Large B-Cell Lymphoma (PMBCL): 3-Year Follow-up of the Keynote-170 Study. *Blood* 2020; 136: 42–43.
109. Cheah CY, Wirth A, Seymour JF. Primary testicular lymphoma. *Blood* 2014; 123: 486–493.
110. Fonseca R, Habermann TM, Colgan JP, O'Neill BP, White WL, Witzig TE et al. Testicular lymphoma is associated with a high incidence of extranodal recurrence. *Cancer* 2000; 88: 154–161.
111. Gundrum JD, Mathiason MA, Moore DB, Go RS. Primary testicular diffuse large B-cell lymphoma: A population-based study on the incidence, natural history, and survival comparison with primary nodal counterpart before and after the introduction of rituximab. *J Clin Oncol* 2009; 27: 5227–5232.
112. Deng L, Xu-Monette ZY, Loghavi S, Manyam GC, Xia Y, Visco C et al. Primary testicular diffuse large B-cell lymphoma displays distinct clinical and biological features for treatment failure in rituximab era: a report from the International PTL Consortium. *Leukemia* 2016; 30: 361–372.

113. Pollari M, Leivonen SK, Leppä S. Testicular Diffuse Large B-Cell Lymphoma-Clinical, Molecular, and Immunological Features. *Cancers (Basel)* 2021; 13: 4049.
114. Mazloom A, Fowler N, Medeiros LJ, Iyengar P, Horace P, Dabaja BS. Outcome of patients with diffuse large B-cell lymphoma of the testis by era of treatment: the M. D. Anderson Cancer Center experience. *Leuk Lymphoma* 2010; 51: 1217–1224.
115. De Zordo T, Stronegger D, Pallwein-Prettner L, Harvey CJ, Pinggera G, Jaschke W et al. Multiparametric ultrasonography of the testicles. *Nat Rev Urol* 2013; 10: 135–148.
116. Tsili AC, Argyropoulou MI, Giannakis D, Sofikitis N, Tsampoulas K. Primary diffuse large B-cell testicular lymphoma: magnetic resonance imaging findings. *Andrologia* 2012; 44 Suppl 1: 845–847.
117. Menter T, Ernst M, Drachneris J, Dirnhofer S, Barghorn A, Went P et al. Phenotype profiling of primary testicular diffuse large B-cell lymphomas. *Hematol Oncol* 2014; 32: 72–81.
118. Li D, Xie P, Mi C. Primary testicular diffuse large B-cell lymphoma shows an activated B-cell-like phenotype. *Pathol Res Pract* 2010; 206: 611–615.
119. Al-Abbadi MA, Hattab EM, Tarawneh MS, Amr SS, Orazi A, Ulbright TM. Primary testicular diffuse large B-cell lymphoma belongs to the nongerminal center B-cell-like subgroup: A study of 18 cases. *Mod Pathol* 2006; 19: 1521–1527.
120. Booman M, Douwes J, Glas AM, de Jong D, Schuurin E, Kluin PM. Primary testicular diffuse large B-cell lymphomas have activated B-cell-like subtype characteristics. *J Pathol* 2006; 210: 163–171.
121. Kraan W, Van Keimpema M, Horlings HM, Schilder-Tol EJM, Oud MECM, Noorduyt LA et al. High prevalence of oncogenic MYD88 and CD79B mutations in primary testicular diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia* 2014 28:3 2013; 28: 719–720.
122. Minderman M, Amir A, Kraan W, Schilder-Tol EJM, Oud MECM, Scheepstra CG et al. Immune evasion in primary testicular and central nervous system lymphomas: HLA loss rather than 9p24.1/PD-L1/PD-L2 alterations. *Blood* 2021; 138: 1194–1197.
123. Chapuy B, Roemer MGM, Stewart C, Tan Y, Abo RP, Zhang L et al. Targetable genetic features of primary testicular and primary central nervous system lymphomas. *Blood* 2016; 127: 869–881.
124. Zucca E, Conconi A, Mughal TI, Sarris AH, Seymour JF, Vitolo U et al. Patterns of outcome and prognostic factors in primary large-cell lymphoma of the testis in a survey by the International Extranodal Lymphoma Study Group. *J Clin Oncol* 2003; 21: 20–27.
125. Avilés A, Nambo MJ, Cleto S, Neri N, Huerta-Guzmán J. Rituximab and dose-dense chemotherapy in primary testicular lymphoma. *Clin Lymphoma Myeloma* 2009; 9: 386–389.
126. Vitolo U, Chiappella A, Ferreri AJM, Martelli M, Baldi I, Balzarotti M et al. First-line treatment for primary testicular diffuse large B-cell lymphoma with rituximab-CHOP, CNS prophylaxis, and contralateral testis irradiation: final results of an international phase II trial. *J Clin Oncol* 2011; 29: 2766–2772.

127. Yan Z, Yao S, Wang Y, Liu Y, Yao Z. Primary Testicular Lymphoma with Central Nervous System Relapse Was Successfully Treated by a Chemo-Free Regimen: A Case Report and Literature Review. *Cancer Manag Res* 2021; 13: 9489–9500.
128. Nayak L, Iwamoto FM, Lacasce A, Mukundan S, Roemer MGM, Chapuy B et al. PD-1 blockade with nivolumab in relapsed/refractory primary central nervous system and testicular lymphoma. *Blood* 2017; 129: 3071–3073.
129. Stroun M, Maurice P, Vasioukhin V, Lyautey J, Lederrey C, Lefort F et al. The Origin and Mechanism of Circulating DNA. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 906: 161–168.
130. Mandel P, Metais P. Nuclear Acids In Human Blood Plasma. *C R Seances Soc Biol Fil* 1948; 142: 241–3.
131. Villatoro S, Mayo-de-las-Casas C, Jordana-Ariza N, Viteri-Ramírez S, Garzón-Ibañez M, Moya-Horno I et al. Prospective detection of mutations in cerebrospinal fluid, pleural effusion, and ascites of advanced cancer patients to guide treatment decisions. *Mol Oncol* 2019; 13: 2633.
132. Werner B, Warton K, Ford CE. Transcending Blood-Opportunities for Alternate Liquid Biopsies in Oncology. *Cancers (Basel)* 2022; 14: 1309.
133. Yao W, Mei C, Nan X, Hui L. Evaluation and comparison of in vitro degradation kinetics of DNA in serum, urine and saliva: A qualitative study. *Gene* 2016; 590: 142–148.
134. Wan JCM, Massie C, Garcia-Corbacho J, Mouliere F, Brenton JD, Caldas C et al. Liquid biopsies come of age: towards implementation of circulating tumour DNA. *Nat Rev Cancer* 2017; 17: 223–238.
135. Hudecova I, Smith CG, Hänsel-Hertsch R, Chilamakuri CS, Morris JA, Vijayaraghavan A et al. Characteristics, origin, and potential for cancer diagnostics of ultrashort plasma cell-free DNA. *Genome Res* 2022; 32: 215–227.
136. Dennis Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CWG et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* 1997; 350: 485–487.
137. Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res* 1977; 37: 646–50.
138. Thierry AR, El Messaoudi S, Gahan PB, Anker P, Stroun M. Origins, structures, and functions of circulating DNA in oncology. *Cancer Metastasis Rev* 2016; 35: 347–376.
139. Sorenson GD, Pribish DM, Valone FH, Memoli VA, Bzik DJ, Yao SL. Soluble normal and mutated DNA sequences from single-copy genes in human blood. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*; 3: 67–71.
140. Diehl F, Schmidt K, Choti MA, Romans K, Goodman S, Li M et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat Med* 2008; 14: 985–990.
141. Fernández-Lázaro D, Hernández JLG, García AC, del Castillo AC, Hueso MV, Cruz-Hernández JJ. Clinical Perspective and Translational Oncology of Liquid Biopsy. *Diagnostics (Basel)* 2020; 10: 443.
142. El Messaoudi S, Rolet F, Mouliere F, Thierry AR. Circulating cell free DNA: Preanalytical considerations. *Clin Chim Acta* 2013; 424: 222–230.

143. Greytak SR, Engel KB, Parpart-Li S, Murtaza M, Bronkhorst AJ, Pertile MD et al. Harmonizing Cell-Free DNA Collection and Processing Practices through Evidence-Based Guidance. *Clin Cancer Res* 2020; 26: 3104–3109.
144. Lee TH, Montalvo L, Chrebtow V, Busch MP. Quantitation of genomic DNA in plasma and serum samples: higher concentrations of genomic DNA found in serum than in plasma. *Transfusion (Paris)* 2001; 41: 276–282.
145. Umetani N, Hiramatsu S, Hoon DSB. Higher Amount of Free Circulating DNA in Serum than in Plasma Is Not Mainly Caused by Contaminated Extraneous DNA during Separation. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1075: 299–307.
146. González Á, Pérez Barrios C, Macher H, Sánchez-Carbayo M, Barco Sánchez A, Fernández Suárez A et al. Recomendaciones preanalíticas para la obtención y análisis de ADN circulante a partir de sangre periférica. Recomendación (2018). *Revista del Laboratorio Clínico* 2019; 12: e40–e46.
147. Lam NYL, Rainer TH, Chiu RWK, Lo YMD. EDTA is a better anticoagulant than heparin or citrate for delayed blood processing for plasma DNA analysis. *Clin Chem* 2004; 50: 256–257.
148. Yokota M, Tatsumi N, Nathalang O, Yamada T, Tsuda I. Effects of heparin on polymerase chain reaction for blood white cells. *J Clin Lab Anal* 1999; 13: 133–40.
149. Schmidt B, Reinicke D, Reindl I, Bork I, Wollschläger B, Lambrecht N et al. Liquid biopsy - Performance of the PAXgene® Blood ccfDNA Tubes for the isolation and characterization of cell-free plasma DNA from tumor patients. *Clin Chim Acta* 2017; 469: 94–98.
150. Meddeb R, Pisareva E, Thierry AR. Guidelines for the Preanalytical Conditions for Analyzing Circulating Cell-Free DNA. *Clin Chem* 2019; 65: 623–633.
151. Schmidt B, Reinicke D, Reindl I, Bork I, Wollschläger B, Lambrecht N et al. Liquid biopsy - Performance of the PAXgene® Blood ccfDNA Tubes for the isolation and characterization of cell-free plasma DNA from tumor patients. *Clin Chim Acta* 2017; 469: 94–98.
152. Kang Q, Henry NL, Paoletti C, Jiang H, Vats P, Chinnaiyan AM et al. Comparative analysis of circulating tumor DNA stability In K 3 EDTA, Streck, and CellSave blood collection tubes. *Clin Biochem* 2016; 49: 1354–1360.
153. Warton K, Yuwono NL, Cowley MJ, McCabe MJ, So A, Ford CE. Evaluation of Streck BCT and PAXgene Stabilised Blood Collection Tubes for Cell-Free Circulating DNA Studies in Plasma. *Mol Diagn Ther* 2017; 21: 563–570.
154. Sorber L, Zwaenepoel K, Jacobs J, De Winne K, Goethals S, Reclusa P et al. Circulating Cell-Free DNA and RNA Analysis as Liquid Biopsy: Optimal Centrifugation Protocol. *Cancers (Basel)* 2019; 11: 458.
155. Meddeb R, Pisareva E, Thierry AR. Guidelines for the Preanalytical Conditions for Analyzing Circulating Cell-Free DNA. *Clin Chem* 2019; 65: 623–633.

156. Haselmann V, Hedtke M, Neumaier M. Liquid Profiling for Cancer Patient Stratification in Precision Medicine-Current Status and Challenges for Successful Implementation in Standard Care. *Diagnostics (Basel)* 2022; 12: 748.
157. Kloten V, Rüchel N, Bröchle NO, Gasthaus J, Freudenmacher N, Steib F et al. Liquid biopsy in colon cancer: comparison of different circulating DNA extraction systems following absolute quantification of KRAS mutations using Intplex allele-specific PCR. *Oncotarget* 2017; 8: 86253–86263.
158. Huet S, Salles G. Potential of Circulating Tumor DNA for the Management of Patients With Lymphoma. *JCO Oncol Pract* 2020; 16: 561–568.
159. Bobillo S, Crespo M, Escudero L, Mayor R, Raheja P, Carpio C et al. Cell free circulating tumor DNA in cerebrospinal fluid detects and monitors central nervous system involvement of B-cell lymphomas. *Haematologica* 2021; 106: 513–521.
160. Lakhoria R, Roschewski M. Circulating tumour DNA in B-cell lymphomas: current state and future prospects. *Br J Haematol* 2021; 193: 867–881.
161. Roschewski M, Rossi D, Kurtz DM, Alizadeh AA, Wilson WH. Circulating Tumor DNA in Lymphoma: Principles and Future Directions. *Blood Cancer Discov* 2022; 3: 5–15.
162. Roschewski M, Dunleavy K, Pittaluga S, Moorhead M, Pepin F, Kong K et al. Circulating tumour DNA and CT monitoring in patients with untreated diffuse large B-cell lymphoma: a correlative biomarker study. *Lancet Oncol* 2015; 16: 541–9.
163. Lakhoria R, Melani C, Dunleavy K, Pittaluga S, Saba NS, Lindenberg L et al. Circulating Tumor DNA Predicts Therapeutic Outcome in Mantle Cell Lymphoma. *Blood Adv* 2022; 6: 2667-2680.
164. Sarkozy C, Huet S, Carlton VEH, Fabiani B, Delmer A, Jardin F et al. The prognostic value of clonal heterogeneity and quantitative assessment of plasma circulating clonal IG-VDJ sequences at diagnosis in patients with follicular lymphoma. *Oncotarget* 2017; 8: 8765.
165. Kurtz DM, Green MR, Bratman S V., Scherer F, Liu CL, Kunder CA et al. Noninvasive monitoring of diffuse large B-cell lymphoma by immunoglobulin high-throughput sequencing. *Blood* 2015; 125: 3679–3687.
166. Scherer F, Kurtz DM, Newman AM, Stehr H, Craig AFM, Esfahani MS et al. Distinct biological subtypes and patterns of genome evolution in lymphoma revealed by circulating tumor DNA. *Sci Transl Med* 2016; 8: 364ra155.
167. Kurtz DM, Scherer F, Jin MC, Soo J, Craig AFM, Esfahani MS et al. Circulating Tumor DNA Measurements As Early Outcome Predictors in Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *J Clin Oncol* 2018; 36: 2845–2853.
168. Rossi D, Diop F, Spaccarotella E, Monti S, Zanni M, Rasi S et al. Diffuse large B-cell lymphoma genotyping on the liquid biopsy. *Blood* 2017; 129: 1947–1957.
169. Kurtz DM, Soo J, Co Ting Keh L, Alig S, Chabon JJ, Sworder BJ et al. Enhanced detection of minimal residual disease by targeted sequencing of phased variants in circulating tumor DNA. *Nat Biotechnol* 2021; 39: 1537–1547.

170. Kurtz DM. Prognostication with circulating tumor DNA: is it ready for prime time? *Hematology* 2019; 2019: 47–52.
171. Piroso MC, Borchmann S, Jardin F, Gaidano G, Rossi D. Controversies in the Interpretation of Liquid Biopsy Data in Lymphoma. *Hemasphere* 2022; 6: e727.
172. Hiemcke-Jiwa LS, Leguit RJ, Snijders TJ, Bromberg JEC, Nierkens S, Jiwa NM et al. MYD88 p.(L265P) detection on cell-free DNA in liquid biopsies of patients with primary central nervous system lymphoma. *Br J Haematol* 2019; 185: 974–977.
173. Suehara Y, Sakata-Yanagimoto M, Hattori K, Nanmoku T, Itoh T, Kaji D et al. Liquid biopsy for the identification of intravascular large B-cell lymphoma. *Haematologica* 2018; 103: e241–e244.
174. Camus V, Stamatoullas A, Mareschal S, Viailly PJ, Sarafan-Vasseur N, Bohers E et al. Detection and prognostic value of recurrent exportin 1 mutations in tumor and cell-free circulating DNA of patients with classical Hodgkin lymphoma. *Haematologica* 2016; 101: 1094–1101.
175. Spina V, Brusca A, Cuccaro A, Martini M, Trani M Di, Forestieri G et al. Circulating tumor DNA reveals genetics, clonal evolution, and residual disease in classical Hodgkin lymphoma. *Blood* 2018; 131: 2413–2425.
176. Sarkozy C, Huet S, Carlton VEH, Fabiani B, Delmer A, Jardin F et al. The prognostic value of clonal heterogeneity and quantitative assessment of plasma circulating clonal IG-VDJ sequences at diagnosis in patients with follicular lymphoma. *Oncotarget* 2017; 8: 8765.
177. Rossi D, Diop F, Spaccarotella E, Monti S, Zanni M, Rasi S et al. Diffuse large B-cell lymphoma genotyping on the liquid biopsy. *Blood* 2017; 129: 1947–1957.
178. Jin MC, Kurtz DM, Esfahani MS, Scherer F, Craig AFM, Soo J et al. Noninvasive detection of clinically relevant copy number alterations in diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 2017; 35:15_suppl, 7507.
179. Miljkovic MD, Melani C, Pittaluga S, Lakhotia R, Lucas N, Jacob A et al. Next-generation sequencing-based monitoring of circulating tumor DNA reveals clonotypic heterogeneity in untreated PTCL. *Blood Adv* 2021; 5: 4198–4210.
180. Pastore A, Jurinovic V, Kridel R, Hoster E, Staiger AM, Szczepanowski M et al. Integration of gene mutations in risk prognostication for patients receiving first-line immunochemotherapy for follicular lymphoma: a retrospective analysis of a prospective clinical trial and validation in a population-based registry. *Lancet Oncol* 2015; 16: 1111–1122.
181. Alig S, Macaulay CW, Kurtz DM, Dührsen U, Hüttmann A, Schmitz C et al. Short Diagnosis-to-Treatment Interval Is Associated With Higher Circulating Tumor DNA Levels in Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *J Clin Oncol* 2021; 39: 2605–2616.
182. Kurtz DM, Esfahani MS, Scherer F, Soo J, Jin MC, Liu CL et al. Dynamic Risk Profiling Using Serial Tumor Biomarkers for Personalized Outcome Prediction. *Cell* 2019; 178: 699-713.e19.
183. Delfau-Larue MH, Van Der Gucht A, Dupuis J, Jais JP, Nel I, Beldi-Ferchiou A et al. Total metabolic tumor volume, circulating tumor cells, cell-free DNA:

- Distinct prognostic value in follicular lymphoma. *Blood Adv* 2018; 2: 807–816.
184. Chheng H-JJ, Sun R, Sugg B, Irwin R, Yang H, Le CC et al. Risk assessment with low-pass whole-genome sequencing of cell-free DNA before CD19 CAR T-cell therapy for large B-cell lymphoma. *Blood* 2022; 140: 504–515.
 185. Sobesky S, Mammadova L, Cirillo M, Drees EEE, Mattlener J, Dörr H et al. In-depth cell-free DNA sequencing reveals genomic landscape of Hodgkin's lymphoma and facilitates ultrasensitive residual disease detection. *Med* 2021; 2: 1171-1193.e11.
 186. Cheah CY, Hofman MS, Dickinson M, Wirth A, Westerman D, Harrison SJ et al. Limited role for surveillance PET–CT scanning in patients with diffuse large B-cell lymphoma in complete metabolic remission following primary therapy. *Br J Cancer* 2013; 109: 312.
 187. Thompson CA, Ghesquieres H, Maurer MJ, Cerhan JR, Biron P, Ansell SM et al. Utility of routine post-therapy surveillance imaging in diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 2014; 32: 3506–3512.
 188. Scherer F. Capturing Tumor Heterogeneity and Clonal Evolution by Circulating Tumor DNA Profiling. *Recent Results Cancer Res.* 2020; 215: 213-230.
 189. Agarwal R, Chan YC, Tam CS, Hunter T, Vassiliadis D, Teh CE et al. Dynamic molecular monitoring reveals that SWI–SNF mutations mediate resistance to ibrutinib plus venetoclax in mantle cell lymphoma. *Nature Medicine* 2018; 25: 119–129.
 190. Yeh P, Hunter T, Sinha D, Ftouni S, Wallach E, Jiang D et al. Circulating tumour DNA reflects treatment response and clonal evolution in chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Commun* 2017; 8: 14756.
 191. Scherer F, Kurtz DM, Newman AM, Craig A, Stehr H, Zhou L et al. Noninvasive Detection of Ibrutinib Resistance in Non-Hodgkin Lymphoma Using Cell-Free DNA. *Blood* 2016; 128: 1752.
 192. Szwed B, Kurtz DM, Alig S, Frank MJ, Macauley CW, Garofalo A et al. Determinants of resistance to engineered T cell therapies targeting CD19 in large B cell lymphomas. *Cancer Cell.* 2023; 41: 210-225.e5.
 193. Smith M, Jegede O, Parekh S, Hanson CA, Martin P, Till BG et al. Minimal Residual Disease (MRD) Assessment in the ECOG1411 Randomized Phase 2 Trial of Front-Line Bendamustine-Rituximab (BR)-Based Induction Followed By Rituximab (R) ± Lenalidomide (L) Consolidation for Mantle Cell Lymphoma (MCL). *Blood* 2019; 134: 751.
 194. Bohers E, Viailly P-J, Becker S, Marchand V, Ruminy P, Maingonnat C et al. Non-invasive monitoring of diffuse large B-cell lymphoma by cell-free DNA high-throughput targeted sequencing: analysis of a prospective cohort. *Blood Cancer J* 2018; 8: 74.
 195. Frank MJ, Hossain NM, Bukhari A, Dean E, Spiegel JY, Claire GK et al. Monitoring of Circulating Tumor DNA Improves Early Relapse Detection After Axicabtagene Ciloleucel Infusion in Large B-Cell Lymphoma: Results of a Prospective Multi-Institutional Trial. *J Clin Oncol* 2021; 39: 3034–3043.
 196. Meriranta L, Alkodsai A, Pasanen A, Lepistö M, Mapar P, Blaker YN et al. Molecular features encoded in the ctDNA reveal heterogeneity and predict

- outcome in high-risk aggressive B-cell lymphoma. *Blood* 2022; 139: 1863–1877.
197. Lauer EM, Mutter J, Scherer F. Circulating tumor DNA in B-cell lymphoma: technical advances, clinical applications, and perspectives for translational research. *Leukemia* 2022; 36: 2151–2164.
 198. Camus V, Viennot M, Lévêque E, Viailly P-J, Tonnelet D, Veresezan E-L et al. Circulating tumor DNA in primary mediastinal large B-cell lymphoma versus classical Hodgkin lymphoma: a retrospective study. *Leuk Lymphoma* 2022; : 1–11.
 199. Karube K, Enjuanes A, Dlouhy I, Jares P, Martin-Garcia D, Nadeu F et al. Integrating genomic alterations in diffuse large B-cell lymphoma identifies new relevant pathways and potential therapeutic targets. *Leukemia* 2018; 32: 675–684.
 200. Chen X, Chang CW, Spoerke JM, Yoh KE, Kapoor V, Baudo C et al. Low-pass whole-genome sequencing of circulating cell-free DNA demonstrates dynamic changes in genomic copy number in a squamous lung cancer clinical cohort. *Clin Cancer Res* 2019; 25: 2254–2263.
 201. Frank MJ, Hossain NM, Bukhari A, Dean E, Spiegel JY, Claire GK et al. Monitoring of Circulating Tumor DNA Improves Early Relapse Detection After Axicabtagene Ciloleucel Infusion in Large B-Cell Lymphoma: Results of a Prospective Multi-Institutional Trial. *J Clin Oncol* 2021; 39: 3034–3043.
 202. Le Goff E, Blanc-Durand P, Roulin L, Lafont C, Loyaux R, MBoumbae DL et al. Baseline circulating tumour DNA and total metabolic tumour volume as early outcome predictors in aggressive large B-cell lymphoma. A real-world 112-patient cohort. *Br J Haematol* 2023. doi:10.1111/BJH.18809.
 203. Mikhaeel NG, Heymans MW, Eertink JJ, de Vet HCW, Boellaard R, Dührsen U et al. Proposed New Dynamic Prognostic Index for Diffuse Large B-Cell Lymphoma: International Metabolic Prognostic Index. *J Clin Oncol* 2022; 40: 2352–2360.
 204. Thompson CA, Ghesquieres H, Maurer MJ, Cerhan JR, Biron P, Ansell SM et al. Utility of routine post-therapy surveillance imaging in diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 2014; 32: 3506–3512.
 205. Huntington SF, Svoboda J, Doshi JA. Cost-effectiveness analysis of routine surveillance imaging of patients with diffuse large B-cell lymphoma in first remission. *J Clin Oncol* 2015; 33: 1467–1474.
 206. Dean EA, Mhaskar RS, Lu H, Mousa MS, Krivenko GS, Lazaryan A et al. High metabolic tumor volume is associated with decreased efficacy of axicabtagene ciloleucel in large B-cell lymphoma. *Blood Adv* 2020; 4: 3268–3276.
 207. Wong J. Genetic Determinants of Isolated and Systemic Testicular Diffuse Large B-Cell Lymphoma Highlight a Disease Spectrum. *Blood* 2022; 140 (Supplement 1): 6374–6375.
 208. Lacy SE, Barrans SL, Beer PA, Painter D, Smith AG, Roman E et al. Targeted sequencing in DLBCL, molecular subtypes, and outcomes: a Haematological Malignancy Research Network report. *Blood* 2020; 135: 1759–1771.

209. Radke J, Ishaque N, Koll R, Gu Z, Schumann E, Sieverling L et al. The genomic and transcriptional landscape of primary central nervous system lymphoma. *Nat Commun* 2022; 13: 2558.
210. Cao X xin, Li J, Cai H, Zhang W, Duan M hui, Zhou D bin. Patients with primary breast and primary female genital tract diffuse large B cell lymphoma have a high frequency of MYD88 and CD79B mutations. *Ann Hematol* 2017; 96: 1867–1871.
211. Franco F, González-Rincón J, Lavernia J, García JF, Martín P, Bellas C et al. Mutational profile of primary breast diffuse large B-cell lymphoma. *Oncotarget* 2017; 8: 102888–102897.
212. Gonzalez-Farre B, Ramis-Zaldivar JE, Castrejón De Anta N, Rivas-Delgado A, Nadeu F, Salmeron-Villalobos J et al. Intravascular Large B-Cell Lymphoma Genomic Profile Is Characterized by Alterations in Genes Regulating NF-κB and Immune Checkpoints. *Am J Surg Pathol* 2023; 47: 202–211.
213. Monti S, Chapuy B, Takeyama K, Rodig SJ, Hao Y, Yeda KT et al. Integrative Analysis Reveals an Outcome-associated and Targetable Pattern of p53 and Cell Cycle Deregulation in Diffuse Large B-cell Lymphoma. *Cancer Cell* 2012; 22: 359.
214. Hernando E, Nahlé Z, Juan G, Diaz-Rodriguez E, Alaminos M, Hemann M et al. Rb inactivation promotes genomic instability by uncoupling cell cycle progression from mitotic control. *Nature* 2004; 430: 797–802.
215. Mo SS, Geng H, Cerejo M, Wen KW, Solomon DA, Rubenstein JL. Next-Generation Sequencing of Newly-Diagnosed Primary CNS Lymphoma Reveals Alterations in BTG1, ETV6, and 6p Are Associated with Chemoresistance and Inferior Progression-Free Survival. *Blood* 2022; 140: 3516–3517.
216. Bruno A, Boisselier B, Labreche K, Marie Y, Polivka M, Jouvét A et al. Mutational analysis of primary central nervous system lymphoma. *Oncotarget* 2014; 5: 5065–5075.
217. Nadeu F, Martin-Garcia D, Clot G, Díaz-Navarro A, Duran-Ferrer M, Navarro A et al. Genomic and epigenomic insights into the origin, pathogenesis, and clinical behavior of mantle cell lymphoma subtypes. *Blood* 2020; 136: 1419–1432.
218. Puente XS, Beà S, Valdés-Mas R, Villamor N, Gutiérrez-Abril J, Martín-Subero JI et al. Non-coding recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature* 2015; 526: 519–524.
219. Lee B, Lee H, Cho J, Yoon SE, Kim SJ, Park WY et al. Mutational Profile and Clonal Evolution of Relapsed/Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Front Oncol* 2021; 11: 628807.

