



Nuevos marcadores pronósticos derivados de las firmas del microambiente tumoral en linfoma difuso de células grandes

Teresa Cardesa Salzmann



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement 3.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento 3.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution 3.0. Spain License.**

**NUEVOS MARCADORES PRONÓSTICOS DERIVADOS DE LAS “SIGNATURAS” DEL
MICROAMBIENTE TUMORAL EN LINFOMA DIFUSO DE CÉLULAS GRANDES**

Tesis presentada por Teresa Cardesa Salzmänn para aspirar al grado de Doctora en Medicina

Director de tesis Prof. Dr. Elías Campo Güerri

Codirector: Dr Lluís Colomo Saperas

Facultad de Medicina

Universidad de Barcelona

Tutor de tesis: Prof. Dr. Elías Campo Güerri

Barcelona, 2013

Índice

Agradecimientos

I Introducción - Linfoma difuso de células grandes

II Hipótesis y objetivos del estudio

1: Hipótesis

2: Objetivos

Objetivos generales

Objetivos específicos

III Resultados

1. Primer trabajo

1.1 Resumen

1.2 High microvessel density determines a poor outcome in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab plus chemotherapy. Haematologica. 2011; 96(7):996-1001.

2. Segundo trabajo

2.1 Resumen

2.2 A new biologic prognostic model based on immunohistochemistry predicts survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma. Blood. 2012; 120(11):2290-6.

IV Discusión

V Conclusiones

VI Material derivado de los trabajos

VII Financiación de los trabajos

VIII Bibliografía

Agradecimientos

A César, mi esposo. Gracias por acompañarme desde que nos conocimos en mi ilusión por la investigación y por la Hemato-Oncología Pediátrica. Gracias por ser el mejor esposo, el mejor papá, mi pilar de apoyo en todo momento. Gracias por ser siempre mi evaluador más crítico, franco, por ser la cara de los dos que pisa con los pies en el suelo. Juntos le daremos la vuelta al mundo.

Gracias a nuestras hijas Marta, Laura y Sara. Las tres me han acompañado en las diferentes etapas de la elaboración de esta tesis doctoral. Marta y Laura me han acompañado muchas tardes pipeteando, leyendo, escribiendo. Sarita ha ido creciendo mientras escribí la tesis, bella, fuerte, inmune a momentos difíciles de la vida. Ellas son un regalo inmenso del cielo.

Gracias a mis padres, a ellos se lo debo todo. Gracias por apoyarme en todos los aspectos de mi vida. Gracias por acompañarme siempre en mi ilusión por la investigación. La distancia nunca nos separará. Lo que me llevo de mi casa es el amor en el hogar, el compromiso con el trabajo, la abnegación, la fortaleza para superar momentos difíciles. Siempre serán mi ejemplo para la vida.

Gracias a mi hermano por todo el tiempo y amor que le ha dedicado a nuestras hijas.

Gracias a mis abuelos. Ellos han sido ejemplo para mis padres y lo siguen siendo para nosotros.

Gracias al Prof Dr Elías Campo por aceptar dirigir mi tesis doctoral. Por el tiempo dedicado a los trabajos que componen esta tesis, por su consejo, por ser ejemplo de rigurosidad en la investigación en Hemato-Oncología.

Al Dr Lluís Colomo, gracias por codirigir esta tesis doctoral. Gracias por su visión práctica, por su dedicación, por su consejo a lo largo de estos años.

Al Dr Armando López Guillermo gracias por su enorme apoyo en la elaboración de las publicaciones, por su aportación con los datos de seguimiento clínico y la evaluación estadística, por ser ejemplo de excelente hematólogo clínico e investigador.

Al Dr Jaume Mora, que siempre me ha abierto nuevos caminos. Mi ejemplo como investigador translacional, gracias por abrirme las puertas a su laboratorio de investigación de Oncología Pediátrica cuando todavía era residente de Pediatría, gracias por abrirme las puertas a MSKCC, gracias por permitirme todos estos años compartir clínica e investigación, siempre le guardaré una enorme gratitud y afecto.

A la Dra Carmen de Torres gracias por ser maestra minuciosa y estricta en las técnicas moleculares en el laboratorio de Oncología Pediátrica. Su rigor en la investigación siempre me acompañará.

Del “Juniors’ Room”, gracias a Sandra Valera, a Mileyka Herrera, a Anna Mozos, a Alba Díaz, a Dani Martínez y a Davide Soldini por su amistad y su compañerismo.

Gracias a las técnicas de laboratorio Eva, Ingrid, Laura y Mónica, gracias por su ayuda desinteresada.

I_ INTRODUCCIÓN – LINFOMA DIFUSO DE CÉLULAS GRANDES

Definición

De acuerdo a la clasificación de tumores linfoides y hematopoyéticos de la WHO 2008, el linfoma difuso de células grandes (LDCG) se define como una neoplasia de linfocitos B de gran tamaño con tamaño nuclear igual o superior al del núcleo de un macrófago o más de dos veces el tamaño de un linfocito normal, con un patrón de crecimiento difuso.

Estudios morfológicos, biológicos y clínicos han subdividido el LDCG en variantes morfológicas, moleculares e inmunofenotípicas, con subtipos y entidades bien definidas (Tabla 1).

Epidemiología

El LDCG NOS constituye el 25-30% de los LDCG en adultos. Es más frecuente en ancianos. La edad media de presentación es en la séptima década, aunque también aparece en niños y adultos jóvenes. Es discretamente más frecuente en varones que mujeres (Armitage, 1998).

Etiología

La etiología del LDCG NOS sigue siendo desconocida. Generalmente aparece *de novo* (primario), pero también puede aparecer como una progresión o transformación (secundario) de un linfoma menos agresivo, como la leucemia linfática crónica, el linfoma folicular, el linfoma de zona marginal o el linfoma de Hodgkin de predominio nodular linfocítico. Las inmunodeficiencias primarias son un factor de riesgo significativo para el LDCG. Los LDCG NOS que aparecen en el contexto de inmunodeficiencias son más frecuentemente Epstein-Barr (EBV) positivos que los LDCG NOS esporádicos. En LDCG sin inmunodeficiencia, la tasa de infección por EBV es aproximadamente del 10%. (Hummel, 1995), (Park, 1999)

Áreas de afectación

Los pacientes pueden presentarse con afectación nodal o extranodal; en un 40% de los pacientes existe inicialmente afectación extranodal exclusiva (Harris, 1994). La localización extranodal más frecuente es el tracto gastrointestinal (estómago y región ileocecal). Otras localizaciones comunes de presentación extranodal incluyen hueso, testículo, bazo, anillo de Waldeyer, glándulas salivales, tiroides, hígado, riñón y glándula suprarrenal. Existe afectación de médula ósea en un 11-27% de los casos (Campbell, 2006) (Chung, 2007). La detección de enfermedad mínima diseminada en médula ósea puede incrementarse mediante tinciones inmunohistoquímicas o PCR. (Taulikar, 2007). El examen morfológico de sangre periférica

demuestra la presencia de células malignas en sangre periférica en un 29% de los pacientes con afectación de médula ósea. (Arber 2005)

Características clínicas

Los pacientes generalmente presentan masas tumorales de crecimiento rápido en una localización única o múltiple. Aproximadamente la mitad de los pacientes presentan enfermedad en estadio I o II. La mayoría de los pacientes en el momento del diagnóstico presentan sintomatología relacionada con la localización del tumor. (Armitage 1998)

Morfología

En la mayoría de los casos, las adenopatías demuestran una proliferación difusa de células linfoides grandes con borramiento parcial o total de la arquitectura ganglionar normal. El tejido perinodal con frecuencia está infiltrado.

Histológicamente el LDCG NOS es diverso y se subdivide en variantes morfológicas frecuentes y menos comunes. Casos con células de tamaño medio pueden requerir técnicas especiales para excluir leucemias extramedulares, linfoma de Burkitt y formas blásticas de linfomas del manto.

Variantes morfológicas comunes

Existen tres variantes morfológicas comunes y otras variantes menores. Todas estas variantes pueden contener un número elevado de linfocitos T y/o de histiocitos.

Variante centroblastica:

Es la variante más común. Los centroblastos son células linfoides de tamaño medio con núcleos redondos, vesiculares, que contienen cromatina fina con dos a cuatro nucleolos unidos a la membrana nuclear. El citoplasma generalmente es escaso; pueden contener un número variable de inmunoblastos.

Variante inmunoblástica:

Más del 90% de las células son inmunoblastos con un nucléolo único central y un citoplasma más amplio, generalmente basofílico.

Variante anaplásica:

Esta variante se caracteriza por células grandes redondas, ovas o poligonales con núcleos bizarros poligonales, y es biológicamente y clínicamente independiente del linfoma anaplásico de células grandes así como del LDCG-ALK (+).

Inmunofenotipo:

Las células neoplásicas expresan marcadores pan-B como CD19, CD20, CD22 y CD79a. En el 50-75% de los casos existe expresión de IgM, IgG o IgA en la superficie celular o en el citoplasma. (Loddenkemper 2004) La presencia de inmunoglobulinas citoplasmáticas no se asocia a la expresión de marcadores de célula plasmática tal como CD38 o CD138. CD 30 se expresa en la variante anaplásica. (Piris 1990) Las células neoplásicas expresan CD 5 en el 10% de los casos. (Tagawa 2005) Estos casos de LDCG CD5 (+) generalmente son *de novo* y solo raramente se originan de una leucemia linfática crónica. Los LDCG CD5 (+) se diferencian de la variante blastoide del linfoma del manto por la ausencia de expresión de ciclina D1. (Matolcsy, 1995) (Yamaguchi, 2002)

El índice proliferativo detectado por KI67 es alto, generalmente superior al 40%, y en algunos casos superior al 90%. (Miller 1994)

La incidencia reportada de expresión de CD10, BCL6 e IRF4/MUM1 varía. Varios grupos han propuesto una subdivisión inmunofenotípica de la célula de origen (linfocito del centro germinal (GCB) versus linfocito B activado (ABC)) basada en estos marcadores, que sin embargo no se correlaciona de forma adecuada con los resultados de subgrupos basados en estudios de expresión génica. (Rosenwald 2002) (Lenz, 2008) (Gutierrez-García, 2011)

Estudios de expresión génica:

Estudios de expresión génica (Alizadeh 2000) (Rosenwald 2002) han identificado dos subgrupos de expresión génica con valor pronóstico; uno, denominado "*germinal center B-like*" con un perfil de expresión génica similar a los linfocitos B del centro germinal (45-50% de los casos), asociado a un pronóstico más favorable, y otro denominado "*activated B-cell like*" con un patrón de expresión génica similar a los linfocitos B periféricos activados, con peor respuesta a la quimioterapia tipo CHOP. Varios algoritmos inmunohistoquímicos han intentado reproducir la clasificación molecular obtenida en los estudios de expresión génica. Desafortunadamente estos algoritmos siguen siendo una sustitución imperfecta de los *arrays* de expresión génica (Gutierrez-García, 2012) y no deben ser usados para guiar decisiones terapéuticas fuera de ensayos clínicos. La clasificación según célula de origen ha permitido conocer vías patogénicas activadas en los diferentes subtipos que pueden abrir vías para terapias biológicas dirigidas. Adicionalmente a la distinción molecular de acuerdo a la célula de origen, los estudios de expresión génica han identificado "*signaturas*" moleculares relacionadas con el microambiente, que integradas en un modelo estadístico, han demostrado tener valor pronóstico (Lenz 2008). La "*signatura*" estromal tipo 1 incluye a genes relacionados con deposición de matriz extracelular así como infiltración tumoral por macrófagos. La

“signatura” estromal tipo 2 se asocia a genes relacionados con angiogénesis y adipogénesis y tiene un pronóstico desfavorable. Las “signaturas” estromales se hallan presentes de forma variable tanto en los tipos GCB como ABC; la identificación de “signaturas” moleculares correlacionadas con células no malignas del linfoma ofrece la posibilidad de selectivamente tratar desde este nuevo prisma aspectos del microambiente.

Patogénesis molecular:

En el centro germinal los linfocitos B se someten a diferentes procesos genéticos para generar anticuerpos de alta afinidad. Los linfocitos B *naive* tras la estimulación antigénica dependiente de linfocitos T migran a los centros germinales para diferenciarse a centroblastos. En la zona oscura del centro germinal, que está compuesta principalmente por centroblastos con un alto índice proliferativo, las células sufren hipermutación somática de la región variable (IgV) de los genes de las cadenas pesadas y ligeras de las inmunoglobulinas, lo cual resulta en la producción de anticuerpos con gran afinidad por los antígenos. La hipermutación somática se produce a través de cortes en las cadenas del DNA; requiere de la intervención de la *activation-induced cytidine deaminase (AID)* que inicia el proceso convirtiendo deoxicitidinas a uracilos, sobre los cuales posteriormente actúan enzimas reparadores del DNA, conduciendo a reparaciones propensas a errores. La formación y el mantenimiento del centro germinal son dependientes de BCL-6, un represor transcripcional que se expresa de forma elevada en centroblastos, donde permite que las células B sean sometidas a hipermutación somática sin inducir una respuesta indeseada de daño del DNA (*DNA-damage response*). Adicionalmente, BCL-6 inhibe la expresión de diversos factores de transcripción esenciales para la diferenciación a célula plasmática. (Ci 2009)

En la zona clara del centro germinal, mediante la interacción con linfocitos T y células foliculares dendríticas, los centroblastos, que son reexuestos al antígeno para permitir la selección de las células B que producen anticuerpos de gran afinidad para el antígeno, se diferencian a centrocitos. Las células con receptores de inmunoglobulinas de baja afinidad son eliminadas por apoptosis. (Klein 2008) Los centrocitos sufren recombinación de cambio de clase (*class switch recombination*), una recombinación intracromosómica que confiere cambio de clase de las inmunoglobulinas de IgD e IgM a IgG, IgA o IgE. Otro proceso crítico que se inicia en la zona clara del centro germinal es la diferenciación de las células B con receptores Ig de alta afinidad a células plasmáticas efectoras o a células B de memoria. La *down*-regulación de BCL-6 es esencial para permitir la diferenciación B terminal, que se produce a través de activación de CD40 y estimulación de BCR. La activación de CD40 a través de CD40 ligando,

expresado en linfocitos T CD-4(+) conduce a la activación de IRF4 y silenciamiento transcripcional de BCL-6. (Saito 2007) La activación de BCR produce fosforilación de BCL-6 mediada por quinasas activadas por mitógenos (MAPK), seguido de su ubiquitinación y degradación proteasomal. (Niu 1998) La down-regulación de BCL-6 restaura la respuesta a daño del DNA, frena la proliferación y permite la expresión de PRDM1/BLIMP1, un factor de transcripción necesario para la diferenciación a célula plasmática. (Tunayaplin 2004)

La biología del LDCG refleja la existencia de diversos subgrupos derivados de los diferentes estados de diferenciación de las células B neoplásicas, conocidos como subtipos GCB, ABC y linfoma primario mediastínico. Estos subtipos se asocian con alteraciones genéticas características, indicativas de vías patogénicas diferenciales. Las translocaciones cromosómicas que afectan a *BCL2* y a *MYC* así como mutaciones de la metiltransferasa *EZH2* son casi exclusivas del subtipo GCB, mientras que el subtipo ABC se asocia con alteraciones estructurales como inactivación de *PRDM1*, que alteran la diferenciación B terminal y con mutaciones que resultan en la activación constitutiva del complejo transcripcional NFκB, siendo las mutaciones más frecuentes las que afectan a *TNFAIP3*, *CARD11*, *CD79B* y *MYD88*. (Morin 2010; Savage 2009; Pasqualucci 2006; Compagno 2009) Las translocaciones cromosómicas que involucran *CIITA* así como amplificaciones/reordenamientos de los genes que codifican para CD274/PDL1 y CD273/PDL2 ligando son hallazgos recurrentes en linfoma primario mediastínico. (Green 2010; Rui 2010; Steidl 2011) Mediante la combinación de *next generation sequencing* y análisis de número de copias se ha evidenciado que el genoma codificante del LDCG contiene una media de más de 30 alteraciones genéticas clonales por caso. (Pasqualucci 2011) Este análisis también ha revelado que otra característica del genoma del LDCG es la presencia de múltiples lesiones que afectan a los genes que modifican el complejo histona/cromatina; tanto mutaciones somáticas en genes implicados en la regulación de la metilación de las histonas como *EZH2* y *MLL2*, así como inactivación recurrente de las histona acetiltransferasas *CREBBP* y *EP300* (Schneider 2011) y de *MEF2B*, que interactúa con *CREBBP* y *EP300*. (Morin 2011; Lohr 2012) Otro tipo de lesiones características recurrentes son las mutaciones en genes implicados en el reconocimiento inmune por los linfocitos T, presentando mutaciones inactivadoras y deleciones en el gen de la β2-microglobulina (*B2M*). *B2M* codifica para un polipéptido que se expresa en asociación con el complejo mayor de histocompatibilidad tipo I en la superficie de la mayoría de las células nucleadas. Estas mutaciones predicen pérdida de expresión de B2M que es necesaria para la expresión de moléculas HLA tipo I y reconocimiento por linfocitos T citotóxicos. Estas mutaciones permiten

el escape de las células tumorales de los mecanismos de defensa inmunológica en el microambiente tumoral.

Otras mutaciones funcionalmente relevantes pero infrecuentes son las que afectan a *KRAS*, *BRAF* y *NOTCH1*. (Lohr 2012)

Las alteraciones genéticas encontradas en los linfomas no Hodgkin y en el LDCG en particular, incluyen translocaciones cromosómicas, mutaciones causadas por hipermutación somática aberrante, mutaciones somáticas esporádicas y alteraciones en el número de copias, tal como deleciones y amplificaciones.

Mecanismos de alteraciones genéticas en LDCG

Las translocaciones cromosómicas en LNH suelen ser recombinaciones recíprocas y balanceadas que frecuentemente afectan al locus de las inmunoglobulinas, causando expresión disregulada del gen diana.

El término hipermutación somática aberrante, que afecta a un 50% de los casos de LDCG, hace referencia a lesiones genéticas resultantes de la actividad fisiológica aberrante de la maquinaria de hipermutación somática, específicamente al patrón de cambios de nucleótidos, al requerimiento de transcripción y a la distribución a 2kb *downstream* del locus de inicio transcripcional. (Pasqualucci 2001)

Lesiones genéticas asociadas a LDCG tipo GCB

El patrón de expresión génica de los LDCG tipo GCB es similar al de las células B normales del centro germinal. (Alizadeh, 2000) Estos tumores retienen también características típicas de las células del centro germinal tales como la hipermutación somática y la *class switch recombination*. (Lossos, 2000) En un 35% de los casos la translocación t(14;18) conduce a la expresión ectópica de BCL-2, que posee una función anti-apoptótica. Las translocaciones de BCL-2 disregulan BCL-2 yuxtaponiendo elementos reguladores del locus Ig en proximidad con el locus de BCL-2, e interfiriendo también con la inhibición por BCL-6. (Saito, 2009) Un 40% de los casos de LDCG sin la t(14;18) coexpresan BCL-2 y BCL-6 como resultado de la disregulación de Miz1, la molécula a través de la cual BCL-6 se une al promotor de BCL-2, por hipermutación somática de las secuencias promotoras de BCL-2 o por mutaciones en la secuencia codificante de BCL-2. Niveles incrementados de expresión de BCL-2 se asocian a un peor pronóstico. (Kramer 1998)

En un 15% de los LDCG, el gen *MYC*, que codifica para un factor de transcripción asociado con linfoma de Burkitt, se encuentra disregulado debido a translocaciones cromosómicas, siendo la más frecuente la t(8;14), que deja la secuencia codificante de *MYC* bajo el control transcripcional del promotor del gen *IgH*. (Ladanyi, 1991) Un 12% de los LDCG tipo GCB presentan amplificaciones de la región *MIGH1* que contiene el cluster de microRNA (miR) 17-92 en el cromosoma 13q. (He, 2005) Este microRNA actúa como un potencial oncogen y acelera la linfomagénesis inducida por *MYC* incrementando la supervivencia y proliferación a través de la inhibición de *PTEN* y de la proteína proapoptótica *BIM*. (Xiao, 2008) Las deleciones de *PTEN* en el cromosoma 10q, que se encuentran en un 11% de los casos pueden conducir a la activación de *AKT* y son más frecuentes en el subtipo GCB que en el ABC. Estas deleciones son mutuamente exclusivas con las amplificaciones del cluster miR-17-92. (Chan, 2010)

La activación de la fosfatidil-inositol-3-quinasa (*PI3K*) activa *AKT* y otras vías que inhiben apoptosis, promueven la proliferación celular, la motilidad celular y la angiogénesis. Un 8% de los casos de LDCG presentan mutaciones en *PI3K* y son mutuamente exclusivos con pérdida de *PTEN*. (Abubaker, 2007)

Las mutaciones en genes que modifican la cromatina afectan con mayor prevalencia a los LDCG tipo GCB. Un 21% de los LDCG tipo GCG presentan mutaciones somáticas recurrentes que afectan a un solo residuo del oncogén *EZH2*. (Morin 2010) *EZH2* es parte de un complejo *polycomb* represivo que codifica para una histona metiltransferasa que trimetila la lisina 27 de la histona H3. Las mutaciones identificadas resultan en un aumento de la capacidad de *EZH2* para trimetilar la histona H3. (Yap 2011) El gen de la histona metiltransferasa *MLL2* presenta mutaciones somáticas en un 30% de los LDCG. La mayoría de las mutaciones producen codones STOP e inserciones con cambio de sentido (*frame-shift*) así como deleciones que en la mayoría de los casos inactivan *MLL2*. (Morin 2010) Myocyte enhancer factor 2B (*MEF2B*) es un miembro de la familia *MADS/MEF2* de proteínas de unión al DNA que cooperan con enzimas modificantes de histonas para regular la expresión génica. *MEF2B* está mutado en un 9% de los LDCG. (Mendez-Lago 2010) Un 39% de los LDCG tipo GCB y un 17% de los LDCG tipo ABC presentan deleciones monoalélicas y mutaciones que inactivan *CREBBP* y *EP300*, unas acetiltransferasas que actúan como coactivadores transcripcionales en múltiples vías de señalización intracelular. Como consecuencia de las mutaciones, *CREBBP/EP300* pierden su capacidad de acetilar *BCL-6* y *p53*. Las mutaciones en la región 5' reguladora de *BCL-6* se encuentran en un 75% de los LDCG y son producto de la hipermutación somática aberrante.

Mediante estudios de *next generation sequencing* se ha dilucidado que las mutaciones de *BCL2* generalmente ocurren en pacientes con reordenamientos de *BCL2/IgH* como resultados de la

hipermutación somática que ocurre de forma fisiológica en el locus *IgH*. Las mutaciones puntuales de *BCL2* son principalmente sinónimas y habitualmente se deben a hipermutación somática mediada por AID (activation-induced cytidine deaminase). Las mutaciones no sinónimas tienden a encontrarse fuera de los dominios BH funcionalmente importantes, lo cual sugiere que existe una selección negativa contra mutaciones de *BCL2* que impliquen una pérdida de función. (Lohr 2012)

Mutaciones genéticas asociadas a LDCG tipo ABC

El subtipo ABC presenta un patrón de expresión génica similar a las células B del centro germinal cometidas a diferenciación B terminal. (Alizadeh 2000) Una característica prominente de la signatura de expresión génica del subtipo ABC es el enriquecimiento en genes diana de la vía de NF- κ B. (Compagno 2009) La activación constitutiva de esta vía en un 30% de los casos se debe a mutaciones bialélicas inactivantes de *TNFAIP3* que codifica para A20, un regulador negativo de NF- κ B, modificador de ubiquitinas. En linfocitos B normales, la activación de NF- κ B a través de BCR requiere de CARD11, una proteína que coordina la activación de la quinasa I κ B kinase β (Rawlings 2006). Un 10% de los LDCG tipo ABC presentan mutaciones en CARD11. La introducción de CARD11 mutado en líneas celulares de linfoma conduce a activación constitutiva de NF- κ B, lo cual sugiere que estas mutaciones de CARD11 activan la vía de NF- κ B en ausencia de activación del BCR. (Lenz 2008) En un 20% de los LDCG tipo ABC existen mutaciones activadoras de *CD 79A* y *CD79B*, que producen señalización BCR crónica activa y activación constitutiva de las vías NF- κ B, PI3K y MAP-quinasa. (Davis 2010) Durante la respuesta inmune normal NF- κ B también se activa a través de la estimulación de los *toll-like receptors* (TLR) y los receptores para IL1 e IL8. (Iwasaki 2010) MYD88 es una proteína adaptadora que coordina el ensamblaje del complejo que activa NF- κ B tras la activación de los TLRs y los receptores de IL-1 e IL-8. (Lin 2010) En un 30% de los LDCG tipo ABC existen mutaciones de *MYD88* en el dominio receptor de Toll/IL-1 que provocan activación constitutiva la vía de NF- κ B, activación de STAT3 a través de JAK-quinasa y secreción de IL-6, IL-10 e INF β . (Ngo 2011) Otras mutaciones que afectan a moduladores de la vía de NF- κ B incluyen TRAF2 (3%), TRAF5 (5%), MAP3K7 (5%) and RANK (8%). (Compagno 2009).

Para la diferenciación hacia plasmablasto y célula plasmática las células B del centro germinal normal requieren *down*-regulación de BCL-6 y expresión de IRF4, BLIMP1 y XBP1. (Shaffer

2006; Klein 2006) En el LDCG tipo ABC se han hallado diferentes alteraciones de esta vía. En un 35% de los casos existen translocaciones de *BCL-6*, localizado en el cromosoma 3q27, siendo dos veces más frecuentes en el tipo ABC que en el tipo GCB. (Iqbal 2007) La expresión constitutiva de *BCL-6* bloquea la diferenciación, disminuye la respuesta apoptótica al daño del DNA mediada por p53 y permite una ventaja proliferativa.

El gen *PRDM1*, localizado en el cromosoma 6q21, que codifica para *BLIMP1*, un represor transcripcional esencial para la diferenciación de los linfocitos B hacia célula plasmática, presenta mutaciones inactivadoras o deleciones en un 30% de los LDCG tipo ABC. Adicionalmente, *BLIMP1* puede sufrir represión transcripcional en casos con *BCL-6* constitutivamente activo como es el caso de pacientes con translocación de *BCL-6*. (Mandelbaum 2010)

Translocaciones cromosómicas: Estudios mediante citogenética han demostrado la existencia de características específicas de los subtipos GCB y ABC (Bea 2004) (Bea 2005). La translocación t(14;18)(q32;q21) que disregula la expresión de *BCL-2*, la amplificación de *C-REL* en el cromosoma 2p, así como ganancias en 12q12 se detectan casi exclusivamente en el LDCG de tipo GCB, mientras que la trisomía 3, ganancias de 3q y 18q21-22 y pérdidas de 6q21-22 se asocian con el subtipo ABC (Rosenwald 2002). Los LDCG tipo GCB tienen hipermutación somática de los genes que codifican para inmunoglobulinas de forma “*ongoing*” lo que sugiere una reentrada de las células tumorales en el centro germinal (Huang 2002), mientras que los LDCG tipo ABC y primario mediastínico (PM) tienen hipermutaciones somáticas de estos genes pero no presentan el fenómeno “*ongoing*”. Estos dos últimos tipos tienen también una activación constitutiva de la vía NF-k-B. Los PM-BCL se caracterizan por la presencia de ganancias y amplificaciones en los cromosomas 9p y 2p. (Joos 1996) (Bentz 2001) (Palanisamy 2002)

Pronóstico

Factores pronósticos clínicos. El Índice Pronóstico Internacional (IPI) se desarrolló en la era pre-rituximab como herramienta clínica para discriminar a grupos de pacientes con linfomas no Hodgkin agresivos de peor pronóstico. Basado en un número de características clínicas asociadas a un pronóstico peor (edad superior a 60 años, estadios III/IV, LDH, ECOG, presencia de enfermedad extranodal) se identificaron 4 grupos pronósticos con supervivencia a los 5 años del 26-73%. La utilidad del IPI fue revisada en pacientes tratados con quimioterapia más rituximab, manteniendo su valor pronóstico (Sehn, 2007). No obstante, el IPI tiene una capacidad limitada para identificar a subgrupos con enfermedad más agresiva que merezcan tratamientos diferentes a R-CHOP. Recientemente se han identificado factores pronósticos negativos clínicos adicionales para pacientes tratados con R-CHOP: Diámetro tumoral máximo superior a 10 cm (Pfreundschuh, 2008) , sexo masculino por presentar un aclaramiento más rápido de rituximab comparado con pacientes de sexo femenino (Müller 2012), presencia de infiltración de médula ósea (Sehn 2011) y presencia de cadenas ligeras libres séricas (Maurer 2011).

No obstante, aunque las herramientas pronósticas clínicas pueden ser fácilmente aplicadas a la clínica diaria, no aportan el conocimiento necesario para aplicar terapias adaptadas con nuevos agentes biológicos para aquellos pacientes de peor pronóstico.

Factores pronósticos moleculares (Tabla 3):

Valor pronóstico de *BCL2*:

BCL2 es una proteína antiapoptótica importante en el desarrollo y diferenciación normal del linfocito B. La sobreexpresión de *BCL2* se ha reportado en un 40-60% de pacientes con LDCG y se ha asociado a un peor pronóstico en pacientes tratados con CHOP (Mounier 2003); sin embargo en pacientes tratados con R-CHOP, se pierde el papel pronóstico de *BCL2* (Iqbal 2006, 2011). La expresión de *BCL2* es predictiva de peor pronóstico en el subtipo GCB por estudios de expresión génica. Esto puede explicarse porque en gran parte de los LDCG tipo GCB existe la translocación t(14;18) que explica la sobreexpresión de *BCL2* en la mayoría de los casos. En el subtipo ABC no se observa la t(14;18), sin embargo *BCL2* está sobreexpresado por amplificación de *BCL2* o activación constitutiva de la vía de NF- κ B.

Valor pronóstico de MYC:

Los reordenamientos del oncogen *MYC* constituyen una característica típica del linfoma de Burkitt y pueden identificarse en el 5-10% de los LDCG. La expresión incrementada de *MYC* promueve la proliferación celular y se asocia a un peor pronóstico, con supervivencias libres de progresión a los 3-5 años entre el 30-35%, la mitad de lo observado en pacientes sin reordenamientos de *MYC*. (Savage 2009, Barrans 2010)

El impacto pronóstico negativo de reordenamientos de *MYC* es independiente de otros factores y en un estudio se asoció a mayor riesgo de recaída en SNC. (Savage 2009)

Los LDCG que presentan translocaciones tanto de *MYC* como de *BCL2* se denominan linfomas “doble-hit” y se asocian a un pronóstico extremadamente malo, con supervivencias inferiores a un año en pacientes tratados con R-CHOP. (Aukema 2011, Johnson 2012) Los pacientes con doble hit se consideran candidatos a tratamientos alternativos dentro de ensayos clínicos.

La expresión proteica de *MYC* incrementada identifica a pacientes con translocaciones y amplificaciones de *MYC*, así como a un subgrupo de pacientes con expresión proteica incrementada que no presentan alteraciones génicas y que comparten un pronóstico desfavorable. (Valera 2013)

Valor pronóstico de marcadores inmunohistoquímicos

El Lunenburg Lymphoma Biomarker Consortium (LLBC) evaluó el valor pronóstico de una serie de marcadores inmunohistoquímicos (*BCL2*, *BCL6*, *CD5*, *CD10*, *MUM1*, *Ki67* y *HLA-DR*) en una cohorte grande pacientes con LDCG tratados con R-CHOP (Salles 2011). De los marcadores testados, sólo *CD5* y *Ki67* estaban asociados a supervivencia en análisis univariante, y *BCL2* tenía significación estadística marginal ($P = 0.09$). El impacto de marcadores biológicos está fuertemente influenciado por el valor pronóstico del IPI. La adición de *BCL2* y *Ki67* al modelo combinado de marcadores biológicos e IPI permite una mejor discriminación pronóstica entre los grupos de bajo riesgo y riesgo bajo-intermedio, así como riesgo intermedio y alto, pero no permite una mejor identificación de pacientes de alto riesgo.

La inmunohistoquímica es una técnica universalmente asequible que puede realizarse en cortes de tejido procesado rutinariamente así como en *microarrays* de tejido sobre un gran número de muestras de forma simultánea. En la evaluación de los resultados obtenidos a partir de *microarrays* de tejidos es importante que se cumpla la representatividad del fragmento seleccionado con respecto a la muestra global. Entre las posibles limitaciones de la inmunohistoquímica están la variabilidad relacionada con aspectos técnicos y con la metodología de evaluación. Un estudio de validación realizado por

el Lunenburg Lymphoma Biomarker Consortium (LLBC) reveló la escasa reproducibilidad de resultados entre patólogos evaluando determinados marcadores inmunohistoquímicos en linfoma; a pesar de la estandarización de técnicas de tinción y unificación de criterios de evaluación, bcl6 y Ki67 continuaron presentando alta variabilidad interobservador. (de Jong 2009). Mediante el análisis computarizado de la imagen es posible disminuir la variabilidad inter- e intraobservador en la cuantificación de los resultados inmunohistoquímicos, permitiendo procesar los resultados inmunohistoquímicos de una forma cuantitativa continua, a diferencia de los resultados semicuantitativos obtenidos a partir de la evaluación inmunohistoquímica convencional.

Tratamiento

Actualmente el tratamiento establecido de primera línea es R-CHOP-21. Mientras que CHOP administrado cada 2 semanas (CHOP-14) demostró resultados prometedores en pacientes ancianos, dos estudios recientes randomizados comparando R-CHOP-14 con R-CHOP-21 han demostrado ausencia de ventajas para R-CHOP-14 con aumento de toxicidad. (Zwick, 2012)

Un estudio reciente sugería un aumento de supervivencia añadiendo etopósido a R-CHOP (R-CHOEP) para pacientes jóvenes con LDCG de alto riesgo. (Gang 2012)

El régimen infusional dosis-adaptado R-EPOCH ha demostrado resultados prometedores en un ensayo de fase 2 (Wilson 2008), sin embargo la confirmación de su eficacia está pendiente de que se completen ensayos fase 3 comparándolo con R-CHOP.

El valor de la consolidación con trasplante autólogo de médula ósea en el tratamiento de primera línea del LDCG sigue siendo motivo de controversia. Un estudio randomizado comparando R-CHOP-14 a dosis estándar frente a trasplante autólogo de médula ósea tras quimioterapia a altas dosis acompañada de rituximab demostró ausencia de diferencias en supervivencia. (Nabhan 2012)

En otro ensayo clínico R-CHOEP a dosis convencionales demostró mejores resultados terapéuticos que el tratamiento con altas dosis (R-Mega-CHOEP) seguido de trasplante autólogo de médula ósea para pacientes jóvenes con LDCG de alto riesgo. (Gisselbrecht 2010)

El trasplante autólogo de médula ósea tiene beneficio demostrado en el contexto de pacientes recaídos, sin embargo en el tratamiento de primera línea la consolidación con trasplante autólogo no puede recomendarse de rutina. (Gisselbrecht 2010)

Actualmente el único subgrupo que debe considerarse para tratamientos alternativos a R-CHOP en el marco de un ensayo clínico son pacientes con “doble hit”, dado que su supervivencia con R-CHOP suele ser inferior al año. Actualmente para estos pacientes se

consideran regímenes intensivos tipo Burkitt seguidos de consolidación con trasplante autólogo, dose-adapted EPOCH-R o ensayos clínicos con agentes biológicos nuevos. (Friedberg 2012)

Nuevos tratamientos biológicos

Los estudios de expresión génica han permitido el descubrimiento de potenciales dianas terapéuticas en LDCG.

La tabla 2 recoge algunos de los nuevos agentes biológicos que se están evaluando en LDCG, con su diana terapéutica y el posible subgrupo más beneficiado. Tratamientos dirigidos a inhibir la vía de NF- κ B podrían parecer particularmente atractivos en LDCG tipo ABC, porque se expresa de forma constitutiva en este subgrupo. Los inhibidores directos de la vía están en desarrollo; una forma indirecta de inhibir la vía es a través del bloqueo de la degradación de I κ B β (una proteína inactivadora de NF- κ B) en los proteasomas a través del uso de bortezomib. Pacientes con LDCG en recaída tratados con bortezomib combinado con R-EPOCH del subgrupo ABC tuvieron respuestas muy superiores a los pacientes del subgrupo GCB, con respuestas del 83% vs 13% (p 0.001) y supervivencias medias de 10.8 vs 3.4 meses (p 0.0003). (Dunleavy 2009) Existen actualmente ensayos clínicos abiertos evaluando la adición de bortezomib a R-CHOP comparado con R-CHOP solo para LDCG *de novo*, así como varios ensayos randomizados fase 2 que incluyen de forma exclusiva LDCG tipo ABC.

En un 20% de los LDCG tipo ABC existen mutaciones activadoras de *CD 79A* y *CD79B*, que producen señalización BCR crónica activa y activación constitutiva de las vías NF- κ B, PI3K y MAP-quinasa, así como activación de quinasas distales, que incluyen spleen tyrosine kinase (Syk), Bruton tyrosine kinase (BTK) y protein kinase C (PKC). Múltiples nuevos tratamientos dirigidos a los componentes de esta cascada están bajo evaluación. Fostamatinib disódico, un inhibidor oral de SYK, ha demostrado respuestas en más de un 20% de pacientes con LDCG refractario en ensayos fase 1 y fase 2. (Friedberg 2010)

PCI-32765 (ibrutinib) es un inhibidor oral de BTK que ha demostrado respuestas en un 29% de pacientes con LDCG en un ensayo fase 1. (Advani 2011)

CAL-101, un inhibidor selectivo de PI3K-delta oral, también se encuentra bajo evaluación en varios linfomas, aunque existen escasos datos disponibles para LDCG. (Kahl 2011)

PKC se encuentra distal a la vía de señalización de BCR y se encuentra altamente expresada en LDCG fatales o refractarios. (Shipp 2002) Enzastaurin es un inhibidor selectivo de PKC β con

actividad demostrada en LDCG. (Portlock 2007) Un ensayo clínico fase 3 está evaluando enzastaurin como tratamiento de mantenimiento en pacientes con LDCG de alto riesgo tratados con R-CHOP. Estos ensayos no han evaluado respuesta en función del subtipo molecular, no obstante, dada la activación crónica de la vía de señalización de BCR en el subtipo ABC, este subtipo puede esperarse que se beneficie preferencialmente de estos agentes.

Dada la complejidad de esta cascada con múltiples vías paralelas, es probable que combinaciones de estos agentes puedan dar lugar a los mejores resultados en pacientes seleccionados por subtipo molecular de perfil de expresión génica.

Mutaciones de *EZH2*, que codifica para una histona metiltransferasa, han sido identificados de forma exclusiva en un 22% de LDCG tipo GCB. Inhibidores de *EZH2* podrían representar agentes eficaces en pacientes con esta mutación.

Los estudios de expresión génica han demostrado la importancia del microambiente en el LDCG, sugiriendo que este componente también podría ser tributario de un tratamiento biológico específico.

Los pacientes con alta expresión de la “signatura” estromal tipo 2 podrían beneficiarse de estrategias antiangiogénicas. (Lenz 2008; Cardesa-Salzmán 2011) Bevacizumab, un anticuerpo monoclonal anti-VEGF-A se ha asociado a una actividad limitada como agente único en LDCG recaído/refractario, demostrando algunos pacientes respuestas parciales. (Stopeck 2009) Desafortunadamente, un ensayo fase 3 evaluando la adición de bevacizumab a R-CHOP en pacientes con LDCG *de novo* se tuvo que cerrar prematuramente debido a cardiotoxicidad excesiva.

Lenalidomide, un agente inmunomodulador con actividad antiangiogénica e inhibitoria sobre la vía de NF-K-B, ha demostrado una respuesta global del 35% en linfomas recaídos y refractarios, demostrando actividad preferencial en pacientes con LDCG tipo ABC. (Witzig 2011; Hernandez-Ilizaliturri 2011))

En resumen, el pronóstico del LDCG está influenciado por una relación compleja entre la célula maligna, las células del microambiente y factores genéticos constitucionales del paciente.

II_ HIPOTESIS Y OBJETIVOS DEL ESTUDIO

Los LDCG son un grupo heterogéneo de tumores con diferentes características clínicas y biológicas. La adición de rituximab ha aumentado la supervivencia de estos pacientes en un 10-15% (Coiffier 2002), pero es necesaria una mejor estratificación pronóstica para mejorar los resultados terapéuticos. Los perfiles de expresión génica han demostrado que diferencias en el microambiente del LDCG afectan el pronóstico. Un score predictor de pronóstico derivado de la “signatura” de centro germinal, “signatura” estromal tipo -1 y “signatura” estromal tipo 2 tiene la capacidad de predecir pronóstico en LDCG tratado con R-CHOP (Lenz 2008). Mientras que la “signatura” estromal tipo-1 se asocia a deposición de matriz extracelular e infiltración histiocítica y es pronósticamente favorable, la “signatura” estromal tipo-2, asociada a angiogénesis, confiere un peor pronóstico.

Los estudios de expresión génica aportan información pronóstica robusta, sin embargo no están disponibles de forma rutinaria para la mayoría de los pacientes.

Diversos estudios han aportado evidencia acerca de la importancia de la angiogénesis en la biología de los linfomas (Jorgensen 2007) (Paydas 2008) (Paydas 2009) (Farinha 2010) (Taskinen 2010), así como en LDCG. (Ganjoo 2008) (Gratzinger 2008) (Gratzinger 2010)

La atención creciente hacia nuevos tratamientos antiangiogénicos en neoplasias malignas enfatiza el interés en evaluar la densidad vascular en los tumores para determinar su relevancia pronóstica y el impacto biológico.

El IPI es el marcador pronóstico más utilizado en LDCG, sin embargo, pacientes con el mismo IPI pueden tener respuestas terapéuticas muy diferentes así como supervivencias globales distintas. La evaluación pronóstica es importante para la selección de terapias, inclusión en ensayos clínicos y evaluación de nuevos fármacos.

1. Una estratificación de los pacientes con LDCG de acuerdo a su la densidad vascular tumoral podría ser útil para determinar si ésta posee valor pronóstico y si terapias antiangiogénicas podrían beneficiar a la mayoría de pacientes o solo a un subgrupo de pacientes con LDCG.
2. La creación de un modelo pronóstico biológico basado en inmunohistoquímica que simulara los hallazgos de grupos encontrados mediante estudios de expresión génica incorporando célula de origen así como marcadores de la “signatura”

estromal tipo-1 y tipo-2, podría potencialmente facilitar la estratificación pronóstica a partir de tejido tumoral parafinado.

OBJETIVOS

1. OBJETIVO GENERAL:

El objetivo general de estos estudios fue evaluar y validar las “signaturas” estromales obtenidas a partir de los estudios de expresión génica mediante estudios inmunohistoquímicos en tejido parafinado de LDCG tratado con rituximab más quimioterapia.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

2.1 El objetivo del primer estudio fue analizar si la densidad microvascular en los LDCG, cuantificada a nivel tisular mediante un sistema digital computarizado, tiene relación con

- La “signatura” del estroma determinada por análisis global de los perfiles de expresión de RNA
- Los diferentes subtipos GCB y ABC de los LDCG y
- La conducta biológica del tumor valorada por la progresión libre de enfermedad y la supervivencia global de los enfermos.

2.2 El objetivo del segundo estudio fue determinar el posible valor pronóstico de un modelo inmunohistoquímico basado en biomarcadores seleccionados de las “signaturas” de los perfiles de expresión génica que incluyen la célula de origen y las “signaturas” estromales.

III_ RESULTADOS

PRIMER TRABAJO

High microvessel density determines a poor outcome in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab plus chemotherapy

Haematologica. 2011; 96(7):996-1001.

Teresa M. Cardesa-Salzmann, Luis Colomo, Gonzalo Gutierrez, Wing C. Chan, Dennis Weisenburger, Fina Climent, Eva González-Barca, Santiago Mercadal, Leonor Arenillas, Sergio Serrano, Ray Tubbs, Jan Delabie, Randy D. Gascoyne, Joseph M Connors, Jose L. Mate, Lisa Rimsza, Rita Brazier, Andreas Rosenwald, Georg Lenz, George Wright, Elaine S. Jaffe, Louis Staudt, Pedro Jares, Armando López-Guillermo and Elías Campo.

RESUMEN:

Introducción: El LDCG es una enfermedad heterogénea a nivel clínico y a nivel molecular. Estudios de expresión génica han demostrado que el microambiente tumoral afecta la supervivencia y que la “signatura” relacionada con angiogénesis es desfavorable. La contribución histopatológica de la densidad microvascular a la supervivencia de los pacientes con LDCG tratados con inmunoterapia es desconocida. El propósito de este estudio fue evaluar el impacto pronóstico de la densidad microvascular tisular en dos series independientes de LDCG tratados con inmunoterapia.

Material y métodos: 147 pacientes del proyecto internacional Leukemia Lymphoma Molecular Profiling Project ((LLMPP) (cohorte de “entrenamiento”) y 118 pacientes del grupo catalán de estudio de linfomas (GELCAB) (cohorte de validación) fueron incluidos en el estudio. Las tinciones inmunohistoquímicas para la microvasculatura tisular fueron realizadas con CD31 y cuantificadas con un sistema de análisis de imagen computarizado. El score estromal previamente definido en 110 pacientes del LLMP mediante estudios de expresión génica fue utilizado para analizar correlaciones con los datos obtenidos de microvasculatura tisular.

Resultados: La densidad microvascular correlaciona significativamente con el score estromal. ($r=0.3209$; $P<0.001$). Los pacientes con una alta densidad microvascular demuestran una supervivencia global significativamente inferior tanto en la “cohorte de entrenamiento” (4-year OS 54% vs. 78%; $P=0.004$) como en la “cohorte de validación” (57% vs. 81%; $P=0.006$). En el análisis multivariante en ambos grupos la densidad microvascular fue un factor pronóstico desfavorable independiente del IPI [cohorte de entrenamiento: IPI (riesgo relativo 2.7; $p=0.003$); densidad microvascular (riesgo relativo 1.96; $P=0.002$); cohorte de validación: IPI (riesgo relativo 4.74; $p<0.001$); densidad microvascular (riesgo relativo 2.4; $p=0.016$)].

Conclusiones: Estos hallazgos realzan el impacto de la angiogénesis en la supervivencia de los pacientes con LDCG así como el interés de evaluar tratamientos antiangiogénicos en ensayos clínicos.

High microvessel density determines a poor outcome in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab plus chemotherapy

Teresa M. Cardesa-Salzmann,¹ Luis Colomo,¹ Gonzalo Gutierrez,¹ Wing C. Chan,² Dennis Weisenburger,² Fina Climent,³ Eva González-Barca,⁴ Santiago Mercadal,⁴ Leonor Arenillas,⁵ Sergio Serrano,⁵ Ray Tubbs,⁶ Jan Delabie,⁷ Randy D. Gascoyne,⁸ Joseph M Connors,⁸ Jose L. Mate,⁹ Lisa Rimsza,¹⁰ Rita Brazier,¹¹ Andreas Rosenwald,¹² Georg Lenz,¹³ George Wright,¹⁴ Elaine S. Jaffe,¹⁴ Louis Staudt,¹⁴ Pedro Jares,¹ Armando López-Guillermo,^{1,*} and Elias Campo^{1,*}

¹Hospital Clinic, University of Barcelona, Barcelona, Spain; ²University of Nebraska Medical Centre, Omaha, NE, USA; ³Hospital Universitari de Bellvitge, L'Hospitalet de Llobregat, Spain; ⁴Institut Català d'Oncologia, Hospital Duran i Reynals, L'Hospitalet de Llobregat, Spain; ⁵Hospital del Mar, Barcelona, Spain; ⁶Cleveland Clinic, Cleveland, OH, USA; ⁷The Norwegian Radium Hospital, Oslo, Norway; ⁸British Columbia Cancer Agency, Vancouver, BC, Canada; ⁹Hospital Germans Trias, Badalona, Spain; ¹⁰University of Arizona Cancer Center, Tucson, AZ, USA; ¹¹Oregon Health Sciences University, Portland, OR, USA; ¹²University of Würzburg, Würzburg, Germany; ¹³Molekulares Krebsforschungszentrum (MKFZ) Charité – Universitätsmedizin Berlin; and ¹⁴NCI, NIH, Bethesda, MD, USA

*ALG and EC are co-senior authors

ABSTRACT

Background

Diffuse large B-cell lymphoma is a clinically and molecularly heterogeneous disease. Gene expression profiling studies have shown that the tumor microenvironment affects survival and that the angiogenesis-related signature is prognostically unfavorable. The contribution of histopathological microvessel density to survival in diffuse large B-cell lymphomas treated with immunochemotherapy remains unknown. The purpose of this study is to assess the prognostic impact of histopathological microvessel density in two independent series of patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with immunochemotherapy.

Design and Methods

One hundred and forty-seven patients from the Leukemia Lymphoma Molecular Profiling Project (training series) and 118 patients from the Catalan Lymphoma-Study group-GELCAB (validation cohort) were included in the study. Microvessels were immunostained with CD31 and quantified with a computerized image analysis system. The stromal scores previously defined in 110 Leukemia Lymphoma Molecular Profiling Project cases were used to analyze correlations with microvessel density data.

Results

Microvessel density significantly correlated with the stromal score ($r=0.3209$; $P<0.001$). Patients with high microvessel density showed significantly poorer overall survival than those with low microvessel density both in the training series (4-year OS 54% vs. 78%; $P=0.004$) and in the validation cohort (57% vs. 81%; $P=0.006$). In multivariate analysis, in both groups high microvessel density was a statistically significant unfavorable prognostic factor independent of international prognostic index [training series: international prognostic index (relative risk 2.7; $P=0.003$); microvessel density (relative risk 1.96; $P=0.002$); validation cohort: international prognostic index (relative risk 4.74; $P<0.001$); microvessel density (relative risk 2.4; $P=0.016$)].

Conclusions

These findings highlight the impact of angiogenesis in the outcome of patients with diffuse large B-cell lymphoma and the interest of evaluating antiangiogenic drugs in clinical trials.

Key words: rituximab, aggressive non-Hodgkin's lymphoma, kidney, central nervous system.

Citation: Cardesa-Salzmann TN, Colomo L, Gutierrez G, Chan WC, Weisenburger D, Climent F, González-Barca E, Mercadal S, Arenillas L, Serrano S, Tubbs R, Delabie J, Gascoyne RD, Connors JM, Mate JL, Rimsza L, Brazier R, Rosenwald A, Lenz G, Wright G, Jaffe Es, Staudt L, Jares P, López-Guillermo A and Campo E. High microvessel density determines a poor outcome in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab plus chemotherapy. *Haematologica* 2011;96(7):996-1001. doi:10.3324/haematol.2010.037408

©2011 Ferrata Storti Foundation. This is an open-access paper.

Funding: this work was supported by a grant from the Ministry of Education and Science of Spain (SAF 2008 03630-0 (EC), FIS PI 070409 (ALG) and by the Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer RTICC U.2006-RET2039-0 (EC)

Manuscript received on November 18, 2010. Revised version arrived on March 14, 2011. Manuscript accepted on April 1, 2011.

Armando López-Guillermo, Hematology Department, Hospital Clinic Barcelona, Calle Villarreal 170, Barcelona 08036 Spain. Phone: international +34.932275475. Fax: international +34.932275484. E-mail: alopezg@clinic.ub.es

Introduction

Diffuse large B-cell lymphomas (DLBCL) are a heterogeneous group of tumors with different biological and clinical characteristics highlighted by the diverse clinical outcome of the patients. The addition of rituximab (R) has increased the survival of these patients by 10-15%,¹ but further risk stratification is necessary to improve the treatment strategies and outcome. Gene expression profiling (GEP) studies have shown that differences in the tumor microenvironment of DLBCL affect survival after treatment. A survival-predictor score, based on a multivariate model derived from the germinal center B-cell, stromal-1 and stromal-2 gene expression signatures, has the capability of predicting survival among patients with DLBCL treated with R-CHOP (rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine and prednisone).² While the 'stromal-1-signature', related to extracellular matrix deposition and histiocytic infiltration is prognostically favorable, the angiogenesis-related signature ('stromal-2 signature') is associated with an unfavorable outcome.² GEP studies provide very robust prognostic information but are not routinely available for most patients. Several studies have provided increasing evidence that angiogenesis plays a role in the biology of lymphomas^{3,8} and particularly in DLBCL.⁹⁻¹¹ The increasing attention given to new therapeutic strategies targeting angiogenesis in malignant neoplasias emphasizes the interest in assessing vascular density in the tumors to determine its prognostic relevance and biological impact. In the era of new anti-angiogenic therapies, a reliable stratification of patients with DLBCL according to the vascular density of their tumors may be useful to determine whether these new therapies might benefit all or only a subset of patients.

The purpose of our study was to evaluate whether the microvascular density in DLBCL quantified on tissues by a computer based imaging system has an impact on the outcome of these patients. This analysis was performed in two independent cohorts of patients treated with rituximab-based chemotherapeutic regimens.

Design and Methods

Clinical characteristics

A training group of 147 patients (79 males, 68 females; median age 64 years) with *de novo* DLBCL diagnosed between 1997 and 2007 was selected from the Leukemia Lymphoma Molecular Profiling Project (LLMPP) consortium database based on the availability of formalin-fixed tissue material. Cases with transformed DLBCL, primary mediastinal large B-cell lymphoma (PMBCL), intravascular and primary effusion lymphomas, as well as immunodeficiency-associated tumors were excluded from the study. All patients were treated with rituximab-containing chemotherapy combinations (R-CT), in most cases, R-CHOP. Details of patients' main clinico-biological features, including therapy, are shown in Table 1. Median follow up of surviving patients was 3.7 years (range 0.13-11.3 years). Complete remission (CR) rate was 72%, whereas 4-year progression free survival (PFS) and overall survival (OS) were 56% and 66%, respectively. The definitions of CR, PFS and OS were based on standard criteria.¹²

An independent series of 118 patients (66 males, 52 females; median age 62 years) with *de novo* DLBCL diagnosed between 1999 and 2007 at the hospitals of the Catalan Lymphoma Study consortium (GELCAB) was used to validate the results. Thirty

patients from the Hospital Clinic of Barcelona were initially included in the LLMPP studies and were not, therefore, considered in the GELCAB validation set. Median follow up of surviving patients was 3.85 years (range 0.12-9.7 years). The histological criteria to include the cases were the same as for the LLMPP patients. All the patients received R-CT. Main clinico-biological features of the patients included from the GELCAB series are listed in Table 1. Complete remission rate was 85.7% and 4-year PFS and OS were 63% and 68%, respectively. The list of the participating institutions from the LLMPP and the GELCAB consortiums are detailed in the appendices. Patients gave their informed consent according to the guidelines of the ethics committees involved.

Gene expression profiling (GEP)

Gene-expression profiling data from the LLMPP series were available in 110 cases. This information is accessible at www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?token=hojvaiekdsihq&acc=GSE10846, accession number GSE10846. Molecular subtyping of the DLBCL, according to the GEP signatures, included 47 germinal center B-cell (GCB) DLBCL, 53 activated B-cell (ABC) type DLBCL, and 10 unclassifiable cases. The previously defined gene expression stromal scores were used to analyze the correlations between GEP results and the microvasculature study data.

Immunohistochemistry and blood vessel density measurements

Tissue microarrays (TMAs) were constructed from pre-treatment biopsy specimens using duplicated cores of 1 mm per tumor sample. All cases were reviewed by a panel of experts in hematopathology. Samples were stained in an automated Bond[®] immunostainer with an antibody against CD31 (DAKO; 1/40 dilution, incubation of primary antibody for 30 min, antigen retrieval at pH 6 for 20 min). The microvessel density (MVD) was quantified using the digitalized images of the CD31-stained TMA cores (Figure 1) acquired with an Olympus BX51 microscope at x4 magnification and analyzed with an Olympus Cell B Basic Imaging Software. Microvessel areas were defined as vascular areas delineated by CD31+ staining. The MVD was calculated as the sum of all microvessel areas (μm^2) divided by the total area of the core

Table 1. Main clinical features of LLMPP and GELCAB cohorts.

	LLMPP N=147	GELCAB N=118
Sex (Male/Female)	79/68	66/52
Median age (range)	64 (22-91) years	62 (19-87) years
Ann Arbor stage	I-II= 47.4% (65) III-IV= 51.1% (70)	I-II=43.6% (51) III-IV=56.4% (66)
Extranodal sites		
0-1	87.8% (93)	90.4% (85)
≥2	12.2% (13)	9.6% (9)
IPI score		
0-1: Low risk	42% (60)	34.5% (39)
2-3: Low-intermediate risk		
High-intermediate risk	48.3% (69)	54.3% (50)
4-5: High risk	9.8% (14)	21.2% (24)
Treatment		
R-CHOP	80.5% (128)	91.6% (108)
R-CHOP-"like"*	19.5% (19)	8.4% (10)

*R-CHOP-like regimens - LLMPP series: R-CNOP (rituximab, cyclophosphamide, mitoxantrone, vincristine, prednisone), 12 cases; R-ESHAP (rituximab, etoposide, methylprednisolone, cytarabine, cis-platin), 3; R-CFM (rituximab, cyclophosphamide, fluorouracil, methotrexate), 4. GELCAB series: R-high dose-CHOP/R-ESHAP, 9 cases; R-CNOR, 1.

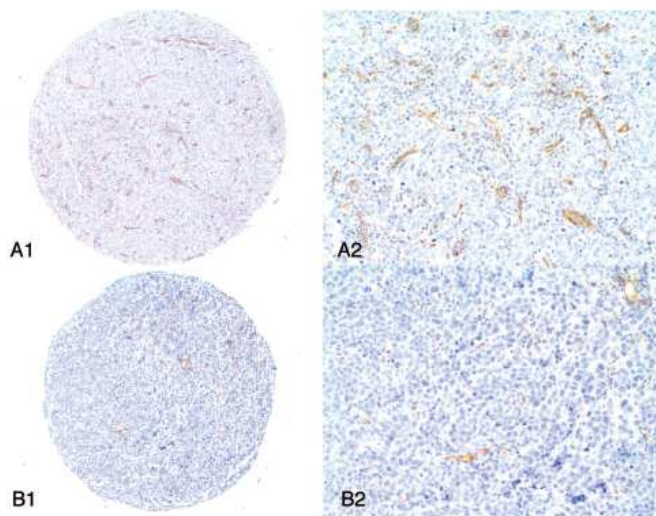


Figure 1. CD31 staining of DLBCL TMA cores. (A1, A2) High microvessel density and (B1, B2) low microvessel density. Image acquisition at x40 (A1, B1) and x100 (A2, B2) with an Olympus SC20 microscope.

analyzed (μm^2). MVD values were grouped in quartiles when necessary and considered high or low when above or below the 50th percentile respectively. TMAs were independently scored by 2 observers and discrepancies were resolved over a double-headed microscope. To determine whether the angiogenic values scored using TMA cores were representative of the tumor sample, in 40 cases microvessels were evaluated in whole tissue sections (WTS) and in TMA cores from the same tumor and compared by linear regression analysis. Three areas of the size of a TMA core rich in neoplastic cells were evaluated on each WTS for CD31+ MVD. The mean value of the three MVD measures in each WTS was compared to the MVD of the corresponding TMA core by linear regression analysis.

Statistical analysis

Categorical data were compared using Fisher's exact test with two-sided *P* values. For ordinal data, non-parametric tests were used. Spearman's correlation test was used to analyze the degree of linear association between MVD and the stromal scores or GEP data. The multivariate analysis of the variables predicting response was performed using a logistic regression analysis. The actuarial survival analysis was performed according to the Kaplan-Meier method, and the curves were compared by log rank test. The multivariate analysis for survival was performed with Cox's stepwise proportional hazards model.

Results

Results in the training series

Microvessel density (MVD)

The microvascular areas of the DLBCL cores showed great variability (Figure 1). The MVD values ranged between 0.77×10^3 and 92.7×10^3 (mean 14×10^3). To determine whether the results obtained in the TMAs were representative of the whole tumor section (WTS), we studied the MVD in TMA cores and in the corresponding WTS of 40 cases. This comparison showed an excellent correlation between the MVD values in both types of samples ($r=0.90$; $P<0.001$).

Microvessel density and gene expression profiling

The stromal score had been previously defined as the component of the multivariate survival model composed by the difference between the stromal-2 and stromal-1 signature averages.³ In the LLMPP DLBCL cohort, there was a significant correlation between MVD and stromal score ($r=0.3209$; $P<0.001$) (Figure 2). The entire set of the genes in the array platform was analyzed for statistical correlation with MVD with none of the genes showing a stronger correlation than that expected by chance. There was no statistically significant correlation between CD31 mRNA expression levels and the immunohistochemical CD31+ MVD.

DLBCL of the GCB type showed MVD mean values that were significantly lower than ABC type DLBCL ($11.8 \pm 12.2 \times 10^3$ vs. $15.0 \pm 12.4 \times 10^3$, respectively; $P=0.05$).

The main clinical features of the LLMPP series according to the MVD (low vs. high MVD) are listed in Table 2. Patients with advanced Ann Arbor stages showed higher MVD values than those with early stages ($P=0.01$). There was no correlation with other initial clinical characteristics. No significant differences were observed in terms of CR rates according to MVD values. Sixty-four patients eventually experienced failure to therapy or relapse with a 4-year PFS of 56% (95%CI: 47-65%). Patients with high MVD in the biopsy had shorter PFS than those with low MVD values (4-year PFS 48% vs. 65%, respectively; $P=0.048$) (Figure 3A). MVD and IPI had independent prognostic value for PFS (Table 3).

After a median follow up for surviving patients of four years, 46 patients had died, with a 4-year OS of 66% (95%CI: 58-74%). Patients with high MVD had a significantly poorer OS than those with low MVD (4-year OS: 54% vs. 78%, respectively; $P=0.004$) (Figure 3B). Other variables predicting poor OS were ABC-type DLBCL as assessed by GEP ($P=0.001$), poor performance status ($P<0.001$), and high serum LDH levels ($P=0.001$). As expected, IPI scores also showed prognostic impact for PFS ($P<0.001$) and OS ($P<0.001$). A multivariate analysis was performed, including IPI (low vs. intermediate vs.

high-risk) and MVD (low vs. high). In the final model, with 143 cases, both IPI (relative risk (RR) 2.7; $P=0.003$) and MVD (RR 1.96; $P=0.002$) maintained independent prognostic significance (Table 3). To analyze whether the prognostic interest of MVD was independent from molecular subtyping (GCB vs. ABC types), MVD (continuous variable) and molecular type were included in the model ($n=100$ cases), with both MVD (RR 1.057; $P<0.001$) and molecular subtype (RR 2.21; $P=0.024$) maintaining their prognostic value for OS. Finally, a multivariate analysis was performed including MVD (low vs. high) along with molecular type (GCB vs. ABC types) and IPI (low vs. inter-

mediate vs. high-risk). In the final model, molecular subtype (RR 2.65; $P=0.004$) and IPI (RR 1.6; $P=0.025$) were the most important variables to predict OS.

Results in the validation cohort

One hundred and eighteen DLBCL patients of the GELCAB were used to validate the LLMPP results. In this series, MVD values ranged between 0.37 and 181×10^{-3} (mean 16×10^{-3}). There was no significant difference between these values and those found in the training set. In the validation set, no correlation was observed between MVD and main clinical features at presentation. The 4-

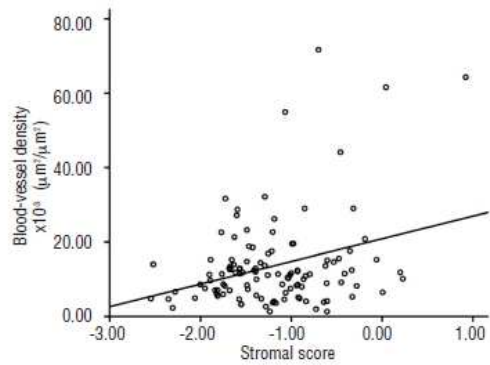


Figure 2. Spearman's correlation test. Linear regression analysis between microvessel density (MVD) and stromal score.

Table 2. Main clinical features and MVD.

	LLMPP (training cohort)		GELCAB (validation set)	
	N=147 MVD low	N=118 MVD high	MVD low	MVD high
Median age (years)	64 (23-91)	64 (30-88)	64 (19-87)	61 (22-83)
Gender (M/F)	37/36	42/32	35/25	31/27
Advanced stage (III-IV) (%)	40	62	53	60
IPI (%)				
Low risk	51	33	39	31
L/I or H/I risk	42	55	44	44
High risk	7	12	17	25
CR rate (%)	79	66	88	83
4-year PFS (%)	65	48 $P=0.048$	72	54 $P=0.03$
4-year OS (%)	78	54 $P=0.004$	81	57 $P=0.006$

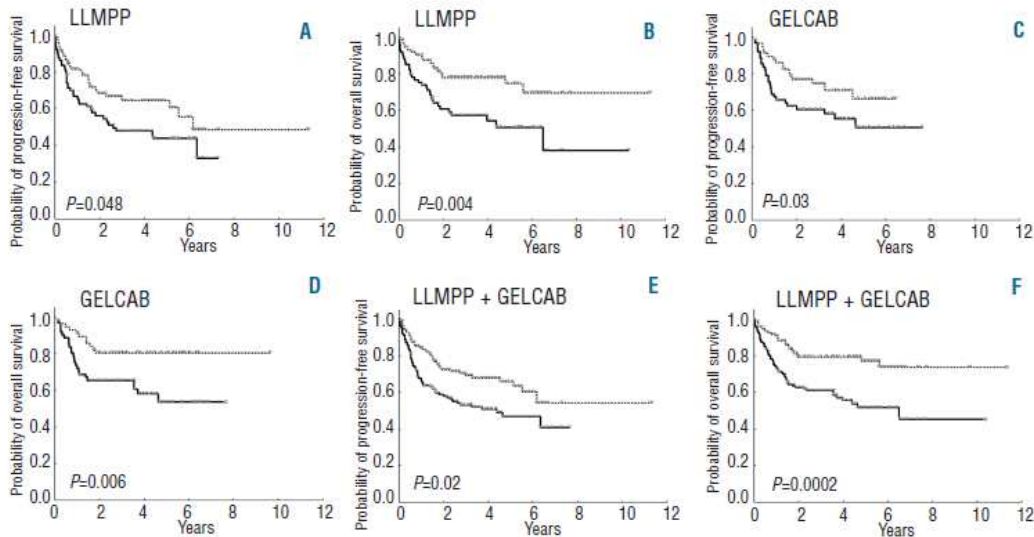


Figure 3. Kaplan-Meier survival analysis according to low and high microvessel density (MVD). (A) Progression-free survival (PFS) and (B) overall survival (OS) for the LLMPP series. (C) PFS and (D) OS for the GELCAB series. (E) PFS and (F) OS in merged analysis of entire series (LLMPP and GELCAB).

Table 3. Summary of multivariate analyses in LLMP and GELCAB series.

	LLMP (training cohort) N=147		GELCAB (validation set) N=118	
	P value	Relative risk	P value	Relative risk
Progression-free survival				
MVD (L vs. H)	0.01	1.6	0.05	1.89
IPI (L vs. I vs. H risk)	0.01	3.1	<0.001	3.7
Overall survival				
MVD (L vs. H)	0.002	1.96	0.016	2.4
IPI (L vs. I vs. H risk)	0.003	2.7	<0.001	4.74

MVD: microvessel density; IPI: International Prognostic Index; L: low; I: intermediate; H: high.

year PFS of the series was 62% (95%CI: 52-72%). Patients with high MVD in the biopsy (Table 2) had shorter PFS than those with low MVD values (4-year PFS 54 vs. 72%, respectively; $P=0.03$) (Figure 3C). After a median follow up for surviving patients of 3.85 years, 35 patients had died, with a 4-year OS of 68% (95%CI: 61-71%). Patients with high MVD showed significantly shorter OS in comparison to those with low MVD (4-year OS 57% vs. 81%, respectively; $P=0.006$) (Figure 3D). A multivariate analysis was performed for the training sample, including IPI (low vs. intermediate vs. high risk) and MVD (low vs. high). In the final model with 111 cases, both IPI (RR 4.74; $P<0.001$) and MVD (RR 2.4; $P=0.016$) maintained independent prognostic importance for OS (Table 3). Finally, the merged analysis of both series, training and validation set, including 265 patients, is shown in Figure 3E and F. Patients with high MVD had shorter PFS than those with low MVD values (4-year PFS 50% vs. 68%, respectively; $P=0.003$) (Figure 3E). Patients with high MVD showed significantly shorter OS in comparison to those with low MVD (4-year OS 55% vs. 79%, respectively; $P=0.0001$) (Figure 3F).

Discussion

In this study, we have shown that differences in the blood vessel density of DLBCLs have a consistent relationship with the outcome of patients treated with R-CT. Patients with a high MVD show a significantly poorer PFS and OS than those with a low MVD. These results were evident in two independent series of DLBCL patients treated with R-CT and maintained their independent prognostic value in a multivariate analysis. Thus, an increased MVD was able to discriminate patients with poor-risk DLBCL independently of the IPI risk groups. The possibility of recognizing patients who have a significantly worse prognosis due to a highly vascularized tumor can be useful in the light of the many new antiangiogenic therapies which are now available and which can be incorporated into clinical trials.

Increased MVD has also been described as a negative prognostic factor in solid tumors but has not been explored in DLBCL treated with R-CT.¹³ The prognostic value of the MVD in our study agrees with previously published GEP data on DLBCL.² The gene expression signatures 'stromal 1' and 'stromal 2', related to extracellular matrix and angiogenesis-related genes, respectively, were

synergistic in predicting survival. These two signatures were combined into the stromal score and high values of this score predicted an adverse clinical outcome.² Interestingly, the MVD measured in our study showed a statistically significant correlation with the GEP global 'stromal score' but not with the individual angiogenesis-related 'stromal-2' signature nor with the CD-31 mRNA expression levels of each case. The fact that there is no relationship between the MVD and the 'stromal-2' signature, which includes CD-31 mRNA expression amongst other genes specifically expressed in the endothelium, suggests that vascular density is not just a direct surrogate of high expression levels of angiogenesis-associated genes. It may reflect an integration of the interplay between angiogenesis-related genes and genes of the 'stromal-1' signature involved in the remodeling of the extracellular matrix that modulate the process of neoangiogenesis in tumors. In fact, the new blood vessels formed in the tumor stroma tend to be highly irregular and tortuous.^{14,15} The MVD measured in this study may capture these morphological features of neoangiogenesis. These findings support the idea that MVD may be a surrogate biomarker of the GEP 'stromal score' in DLBCL and may help to stratify these patients according to the biological risk associated with angiogenesis.

In our study, the ABC-type DLBCLs showed a higher MVD than tumors with a GCB profile. The ABC-type DLBCL arises from a post-germinal center B cell that is blocked during plasmacytic differentiation, whereas the GCB-type DLBCL subtype arises from a germinal center B cell. These two types of DLBCL also differ in their profile of genetic alterations and dysregulation of molecular pathways.^{16,20} In particular, the ABC type DLBCL shows constitutive activation of NF- κ B that may be related to the presence of mutations in multiple genes regulating this pathway.²¹⁻²⁴ The NF- κ B transcription factor has been associated with multiple aspects of angiogenesis by regulating several genes involved in this process such as VEGF, IL-8 and several metalloproteinases, among others.²⁵⁻²⁷ Therefore, the higher MVD observed in the ABC-type DLBCL is concordant with the NF κ B activation of these tumors.

Previous reports have focused on the prognostic value of angiogenesis in DLBCLs.^{9,10} In those studies, microvessel density was evaluated in a semi-quantitative manner and the immunohistochemical markers differed among studies.^{9,10} Although different methods were used for evaluation, these papers suggest that both angiogenesis and lymphangiogenesis play a role in lymphomas, including DLBCL.^{7,8,10,11,28}

We approached the evaluation of angiogenesis in DLBCL using a computerized imaging system. We chose CD31, the platelet adhesion molecule PECAM1, for the immunohistochemical evaluation of the microvessels, since it is one of the genes included in the stromal-2 signature and because it is expressed both on the vascular and lymphatic endothelium as opposed to other markers such as CD34 or FVIII, that are mostly expressed in the vascular endothelium.²⁹ In our study, we have seen that the total microvascular area rather than the number of vessels per area determines the outcome of our patients. This approach captures the biological significance of angiogenesis in DLBCLs and agrees with experimental studies suggesting that the function of the vasculature is more important than the vessel count.^{15,30}

In conclusion, the biological insights gained from this study provide a new perspective for future clinical trials incorporating antiangiogenics. On the basis of the results of both the previous GEP study and the current immunohistochemical MVD analysis, it is possible to suggest that the new antiangiogenic therapies may benefit in particular a subgroup of patients with aggressive DLBCL characterized by a high tumor blood vessel density.

Authorship and Disclosures

The information provided by the authors about contributions from persons listed as authors and in acknowledgments is available with the full text of this paper at www.haematologica.org.

Financial and other disclosures provided by the authors using the ICMJE (www.icmje.org) Uniform Format for Disclosure of Competing Interests are also available at www.haematologica.org.

References

- Coiffier B, Lepage E, Briere J, Herbrecht R, Tilly H, Bouabdallah R, et al. CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med*. 2002;346(4):235-42.
- Lenz G, Wright G, Dave SS, Xiao W, Powell J, Zhao H, et al. Stromal gene signatures in large-B-cell lymphomas. *N Engl J Med*. 2008;359(22):2313-23.
- Jorgensen JM, Sorensen FB, Bendix K, Nielsen JL, Olsen ML, Funder AM, et al. Angiogenesis in non-Hodgkin's lymphoma: clinico-pathological correlations and prognostic significance in specific subtypes. *Leuk Lymphoma*. 2007;48(3):584-95.
- Paydas S, Ergin M, Erdogan S, Seydaoglu G. Prognostic significance of EBV-LMP1 and VEGF-A expressions in non-Hodgkin's lymphomas. *Leuk Res*. 2008;32(9):1424-30.
- Paydas S, Seydaoglu G, Ergin M, Erdogan S, Yavuz S. The prognostic significance of VEGF-C and VEGF-A in non-Hodgkin lymphomas. *Leuk Lymphoma*. 2009;50(3):366-73.
- Tzankov A, Heiss S, Ebner S, Sterlacci W, Schaefer G, Augustin F, et al. Angiogenesis in nodal B cell lymphomas: a high throughput study. *J Clin Pathol*. 2007;60(5):476-82.
- Farinha P, Kyle AH, Minchinton AJ, Connors JM, Karsan A, Gascoyne RD. Vascularization predicts overall survival and risk of transformation in follicular lymphoma. *Haematologica*. 2010;95(12):2157-60.
- Taskinen M, Jantunen E, Kosma VM, Bono P, Karjalainen-Lindsberg ML, Leppa S. Prognostic impact of CD31-positive microvessel density in follicular lymphoma patients treated with immunochemotherapy. *Eur J Cancer*. 2010;46(13):2506-12.
- Ganjo KN, Moore AM, Orazi A, Sen JA, Johnson CS, An CS. The importance of angiogenesis markers in the outcome of patients with diffuse large B cell lymphoma: a retrospective study of 97 patients. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2008;134(3):381-7.
- Grazinger D, Zhao S, Tibshirani RJ, Hsi ED, Hans CP, Pohlman B, et al. Prognostic significance of VEGF, VEGF receptors, and microvessel density in diffuse large B cell lymphoma treated with anthracycline-based chemotherapy. *Lab Invest*. 2008;88(1):38-47.
- Grazinger D, Advani R, Zhao S, Talreja N, Tibshirani RJ, Shyam R, et al. Lymphoma cell VEGFR2 expression detected by immunohistochemistry predicts poor overall survival in diffuse large B cell lymphoma treated with immunochemotherapy (R-CHOP). *Br J Haematol*. 2010;148(2):235-44.
- Cheson BD, Pfistner B, Juweid ME, Gascoyne RD, Specht L, Horning SJ, et al. Revised response criteria for malignant lymphoma. *J Clin Oncol*. 2007;25(5):579-86.
- Mucci LA, Powolny A, Giovannucci E, Liao Z, Kenfield SA, Shen R, et al. Prospective study of prostate tumor angiogenesis and cancer-specific mortality in the health professionals follow-up study. *J Clin Oncol*. 2009;27(33):5627-33.
- Jain RK. Barriers to drug delivery in solid tumors. *Sci Am*. 1994;271(1):58-65.
- Jain RK. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med*. 2003;9(6):685-93.
- Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*. 2000;403(6769):503-11.
- Bea S, Zettl A, Wright G, Salaverria I, Jehn F, Moreno V, et al. Diffuse large B-cell lymphoma subgroups have distinct genetic profiles that influence tumor biology and improve gene-expression-based survival prediction. *Blood*. 2005;106(9):3183-90.
- Davis RE, Ngo VN, Lenz G, Tolar P, Young RM, Romesser PB, et al. Chronic active B-cell-receptor signalling in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature*. 2010;463(7277):88-92.
- Rosenwald A, Wright G, Chan WC, Connors JM, Campo E, Fisher RI, et al. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med*. 2002;346(25):1937-47.
- Tagawa H, Suguro M, Tsuzuki S, Matsuo K, Karnan S, Ohshima K, et al. Comparison of genome profiles for identification of distinct subgroups of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 2005;106(5):1770-7.
- Compagno M, Lim WK, Grunn A, Nandula SV, Brahmachary M, Shen Q, et al. Mutations of multiple genes cause deregulation of NF-kappaB in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature*. 2009;459(7247):717-21.
- Davis RE, Brown KD, Siebenlist U, Staudt LM. Constitutive nuclear factor kappaB activity is required for survival of activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma cells. *J Exp Med*. 2001;194(12):1861-74.
- Feuerhake F, Kutok JL, Monti S, Chen W, LaCasce AS, Castoretti G, et al. NFkappaB activity, function, and target-gene signatures in primary mediastinal large B-cell lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma subtypes. *Blood*. 2005;106(4):1392-9.
- Lenz G, Davis RE, Ngo VN, Lam L, George TC, Wright GW, et al. Oncogenic CARD11 mutations in human diffuse large B cell lymphoma. *Science*. 2008;319(5870):1676-79.
- Huang S, Pettaway CA, Uehara H, Bucana CD, Fidler IJ. Blockade of NF-kappaB activity in human prostate cancer cells is associated with suppression of angiogenesis, invasion, and metastasis. *Oncogene*. 2001;20(31):4188-97.
- Popov Y, Fatsenker E, Bauer M, Niedobitek E, Schulze-Krebs A, Schuppan D. Halofuginone induces matrix metalloproteinases in rat hepatic stellate cells via activation of p38 and NFkappaB. *J Biol Chem*. 2006;281(22):15090-98.
- Tabruyn SP, Griffioen AW. NF-kappa B: a new player in angiostatic therapy. *Angiogenesis*. 2008;11(1):101-6.
- Pazgal I, Boycov O, Shpilberg O, Okon E, Bairey O. Expression of VEGF-C, VEGF-D and their receptor VEGFR-3 in diffuse large B-cell lymphomas. *Leuk Lymphoma*. 2007;48(11):2213-20.
- Ilan N, Madri JA. PECAM-1: old friend, new partners. *Curr Opin Cell Biol*. 2003;15(5):515-24.
- Ellis LM, Hicklin DJ. VEGF-targeted therapy: mechanisms of anti-tumour activity. *Nat Rev Cancer*. 2008;8(8):579-91.

SEGUNDO TRABAJO

A new biologic prognostic model based on immunohistochemistry predicts survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma.

Blood 2012; 120(11):2290-6.

Perry AM, Cardesa-Salzmann TM, Meyer PN, Colomo L, Smith LM, Fu K, Greiner TC, Delabie J, Gascoyne RD, Rimsza L, Jaffe ES, Ott G, Rosenwald A, Braziel RM, Tubbs R, Cook JR, Staudt LM, Connors JM, Sehn LH, Vose JM, López-Guillermo A, Campo E, Chan WC, Weisenburger DD.

RESUMEN

Los factores biológicos que predicen supervivencia en pacientes con LDCG como célula de origen y “signaturas” estromales fueron descubiertos por estudios de expresión génica.

El objetivo del estudio fue intentar simular estos hallazgos y crear un nuevo modelo pronóstico biológico basado en inmunohistoquímica.

199 pacientes con LDCG de novo tratados con R-CHOP u otras combinaciones de inmunoterapia (125 en una cohorte de entrenamiento, 74 en una cohorte de validación) fueron incluidos en el estudio. A partir de tejido parafinado se construyeron arrays de tejidos y a cada factor pronóstico adverso se le concedió un punto (subtipo no-GCB, SPARC <5%, densidad microvascular elevada). Este modelo usando los tres marcadores biológicos demostró ser altamente predictivo de supervivencia global y de supervivencia libre de enfermedad tanto en la cohorte de entrenamiento como en la cohorte de validación tras ajustar para el IPI.

Este nuevo modelo identifica a dos grupos de pacientes, uno con una puntuación biológica baja (0-1) y un pronóstico favorable y otro con una puntuación biológica elevada (2-3) y pronóstico desfavorable. Este modelo pronóstico biológico puede usarse conjuntamente con el IPI para estratificar a pacientes para tratamientos ajustados a su riesgo biológico.

blood

2012 120: 2290-2296
Prepublished online June 26, 2012;
doi:10.1182/blood-2012-05-430389

A new biologic prognostic model based on immunohistochemistry predicts survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma

Anamarija M. Perry, Teresa M. Cardesa-Salzmann, Paul N. Meyer, Luis Colomo, Lynette M. Smith, Kai Fu, Timothy C. Greiner, Jan Delabie, Randy D. Gascoyne, Lisa Rimsza, Elaine S. Jaffe, German Ott, Andreas Rosenwald, Rita M. Braziel, Raymond Tubbs, James R. Cook, Louis M. Staudt, Joseph M. Connors, Laurie H. Sehn, Julie M. Vose, Armando López-Guillermo, Elias Campo, Wing C. Chan and Dennis D. Weisenburger

Updated information and services can be found at:
<http://bloodjournal.hematologylibrary.org/content/120/11/2290.full.html>

Articles on similar topics can be found in the following Blood collections
[Clinical Trials and Observations](#) (3667 articles)
[Free Research Articles](#) (1597 articles)
[Lymphoid Neoplasia](#) (1320 articles)

Information about reproducing this article in parts or in its entirety may be found online at:
http://bloodjournal.hematologylibrary.org/site/misc/rights.xhtml#repub_requests

Information about ordering reprints may be found online at:
<http://bloodjournal.hematologylibrary.org/site/misc/rights.xhtml#reprints>

Information about subscriptions and ASH membership may be found online at:
<http://bloodjournal.hematologylibrary.org/site/subscriptions/index.xhtml>

Blood (print ISSN 0006-4971, online ISSN 1528-0020), is published weekly by the American Society of Hematology, 2021 L St, NW, Suite 900, Washington DC 20036.
Copyright 2011 by The American Society of Hematology; all rights reserved.



A new biologic prognostic model based on immunohistochemistry predicts survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma

Anamarija M. Perry,¹* Teresa M. Cardesa-Salzmann,² Paul N. Meyer,¹ Luis Colomo,² Lynette M. Smith,³ Kai Fu,¹ Timothy C. Greiner,¹ Jan Delabie,⁴ Randy D. Gascoyne,⁵ Lisa Rimsza,⁶ Elaine S. Jaffe,⁷ German Ott,⁸ Andreas Rosenwald,⁹ Rita M. Braziel,¹⁰ Raymond Tubbs,¹¹ James R. Cook,¹² Louis M. Staudt,¹³ Joseph M. Connors,¹⁴ Laurie H. Sehn,¹⁴ Julie M. Vose,¹⁵ Armando López-Guillermo,¹⁶ Elias Campo,² Wing C. Chan,¹ and Dennis D. Weisenburger¹

¹Department of Pathology and Microbiology, University of Nebraska Medical Center, Omaha, NE; ²Department of Pathology, Hospital Clinic, University of Barcelona, Barcelona, Spain; ³Department of Biostatistics, University of Nebraska Medical Center, Omaha, NE; ⁴Department of Pathology, The Norwegian Radium Hospital, Oslo, Norway; ⁵Department of Pathology, British Columbia Cancer Agency, Vancouver, BC; ⁶Department of Pathology, University of Arizona Cancer Center, Tucson, AZ; ⁷Laboratory of Pathology, National Cancer Institute, National Institute of Health, Bethesda, MD; ⁸Department of Clinical Pathology, Robert-Bosch-Krankenhaus and Margarete Fischer-Bosch Institute of Clinical Pharmacology, Stuttgart, Germany; ⁹Department of Pathology, University of Würzburg, Würzburg, Germany; ¹⁰Department of Pathology, Oregon Health Sciences University, Portland, OR; ¹¹Department of Molecular Pathology, Cleveland Clinic, Cleveland, OH; ¹²Department of Clinical Pathology, Cleveland Clinic, Cleveland, OH; ¹³Center for Cancer Research, National Cancer Institute, National Institute of Health, Bethesda, MD; ¹⁴Department of Medicine, British Columbia Cancer Agency, Vancouver, BC; ¹⁵Department of Internal Medicine, University of Nebraska Medical Center, Omaha, NE; and ¹⁶Hematology Department, Hospital Clinic, University of Barcelona, Barcelona, Spain

Biologic factors that predict the survival of patients with a diffuse large B-cell lymphoma, such as cell of origin and stromal signatures, have been discovered by gene expression profiling. We attempted to simulate these gene expression profiling findings and create a new biologic prognostic model based on immunohistochemistry. We studied 199 patients (125 in the training set, 74 in the validation set) with de novo diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab

and CHOP (cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone) or CHOP-like therapies, and immunohistochemical stains were performed on paraffin-embedded tissue microarrays. In the model, 1 point was awarded for each adverse prognostic factor: nongermlinal center B cell–like subtype, SPARC (secreted protein, acidic, and rich in cysteine) < 5%, and microvascular density quartile 4. The model using these 3 biologic markers was highly predictive of

overall survival and event-free survival in multivariate analysis after adjusting for the International Prognostic Index in both the training and validation sets. This new model delineates 2 groups of patients, 1 with a low biologic score (0-1) and good survival and the other with a high score (2-3) and poor survival. This new biologic prognostic model could be used with the International Prognostic Index to stratify patients for novel or risk-adapted therapies. (*Blood*. 2012;120(11):2290-2296)

Introduction

Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) comprises 30%-40% of all non-Hodgkin lymphoma (NHL) cases in the developed world and consists of a heterogeneous group of tumors both morphologically and clinically.¹ The addition of rituximab to the standard chemotherapy protocol of CHOP (cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone) has significantly improved the survival of patients with DLBCL.²⁻⁷ One of the most important clinical predictors of survival in these patients is the International Prognostic Index (IPI).⁸ Although some authors have suggested that the IPI has lost predictive power in the rituximab era, it remains a valuable tool for risk stratification of DLBCL patients.^{6,9}

Gene expression profiling (GEP) can also stratify DLBCL patients into 2 biologic prognostic groups, the germinal center B cell–like (GCB) and activated B cell–like (ABC) subtypes.¹⁰⁻¹² Because genome-wide GEP requires frozen tumor tissue, various immunohistochemical algorithms have been developed for paraffin-embedded tissue to reproduce the GEP findings and predict the cell of origin and survival in DLBCL. One of the most widely accepted methods is the Hans algorithm which uses antibodies against

CD10, BCL6, and MUM1.¹³ Several other algorithms have recently been proposed, including the Choi algorithm which has proven to be a sensitive and specific predictor of cell of origin and survival.^{14,15} Recently, the cellular composition of the tumor microenvironment has also been shown to be a powerful predictor of survival in patients with DLBCL. Lenz et al performed GEP on a large series of DLBCL patients treated with rituximab (R)-CHOP and defined 2 important stromal signatures, stromal-1 and stromal-2.¹⁶ The stromal-1 signature reflects extracellular matrix deposition and histiocyte infiltration, and portends a good prognosis. Meyer et al recently attempted to reproduce the stromal-1 signature using an antibody against SPARC (secreted protein, acidic, and rich in cysteine) to evaluate expression in stromal cells and histiocytes in the tumor microenvironment.¹⁷ They showed that patients with SPARC positivity in the tumor stroma had a significantly longer survival than those without significant SPARC expression. The stromal-2 signature largely reflects angiogenesis and blood vessel density in the tumor stroma, and portends a poor prognosis. Cardesa-Salzmann et al recently attempted to reproduce the

Submitted May 18, 2012; accepted June 14, 2012. Prepublished online as *Blood* First Edition paper, June 26, 2012; DOI 10.1182/blood-2012-05-430389.

*T.M.C.-S. and P.N.M. have equally contributed to the study.

There is an Inside *Blood* commentary on this article in this issue.

The online version of this article contains a data supplement.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 USC section 1734.

stromal-2 signature by measuring microvessel density (MVD) in DLBCL, and found high MVD to be an adverse prognostic factor.¹⁸

Therefore, we attempted to simulate the GEP findings¹⁶ and create a biologic prognostic model (BPM) based on immunohistochemistry that incorporates the cell of origin and surrogates for the stromal-1 and stromal-2 signatures. This model would potentially facilitate risk stratification of DLBCL patients for whom only paraffin-embedded tissue was available for study.

Methods

Patients

Two hundred thirty-five patients with de novo DLBCL treated with rituximab and CHOP or CHOP-like therapies were studied by the Leukemia and Lymphoma Molecular Profiling Project (LLMPP) consortium, and a training set of 125 patients was derived from this cohort based on the patients having complete immunohistochemical data (see "Construction of the prognostic model"). The validation set consisted of 74 patients from the Nebraska Lymphoma Study Group who were also treated with rituximab (R) and CHOP or CHOP-like therapies. The total of 199 patients from the training and validation sets was treated as follows: R-CHOP (166 patients, 83%); R-CNOP (cyclophosphamide, mitoxantrone, vincristine and prednisone; 31 patients, 16%); and R-ESHAP (etoposide, methylprednisolone, cytarabine, and cisplatin; 2 patients, 1%). The following sites participated in the study: Nebraska Lymphoma Study Group, Omaha, Nebraska (60 cases); British Columbia Cancer Agency, Vancouver, British Columbia (51 cases); Norwegian Radium Hospital, Oslo, Norway (43 cases); University of Barcelona, Barcelona, Spain (30 cases); Cleveland Clinic Foundation, Cleveland, Ohio (20 cases); Oregon Health Sciences Center, Portland, Oregon (14 cases); University of Arizona, Tucson, Arizona (12 cases); and the University of Würzburg, Würzburg, Germany (5 cases). This study was approved by the institutional review boards of the respective institutions, and all patients gave written informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki.

The data used in this study originated from 3 previously published studies^{15,17,18} that examined the same cohort of patients. The classification of DLBCL into GCB and non-GCB subtypes was done by Meyer et al,¹⁵ and expression of SPARC in the tumor microenvironment was evaluated in a separate article by Meyer et al.¹⁷ Cardesa-Salzmann et al evaluated the MVD in the same group of patients.¹⁸

Tissue microarray immunohistochemistry

Hematoxylin and eosin-stained sections from a representative formalin-fixed, paraffin-embedded tissue block were used to define diagnostic tumor areas, and 1 to 3 representative tissue cores, 0.6-1.0 mm in diameter, were obtained from each case and inserted into recipient paraffin blocks in a grid pattern using a tissue arrayer (Beecher Instruments). Paraffin-embedded sections 5- μ m thick were then cut and stained according to previously described procedures with antibodies against GCET1, CD10, BCL6, MUM1, FOXP1, CD31, and SPARC (supplemental Table 1, available on the *Blood* Web site; see the Supplemental Materials link at the top of the online article).^{15,17,18} The immunoperoxidase stains, except for CD31, were performed on either a Benchmark XT (Ventana) or Autostainer Plus (DAKO). The cutoffs for tumor positivity were 80% for GCET1, MUM1, and FOXP1, and 30% for CD10 and BCL6 as defined by the Choi algorithm.¹⁴ The scoring of these antibodies was estimated visually in 10% increments by 2 authors (A.M.P. and P.N.M.), and the DLBCL cases were classified as either GCB or non-GCB subtype.¹⁵ The number of stromal cells and histiocytes in the tumor microenvironment that expressed SPARC was also estimated by 2 authors (A.M.P. and P.N.M.) in each case and graded in 5% increments. The number of positive cells ranged from 0%-30%, and 2 groups were defined: SPARC < 5% and SPARC \geq 5%.¹⁷ The agreement between the 2 scoring authors was 90%. Any discrepancies were resolved by joint review over a double-headed microscope. Immunoperoxidase staining for CD31 was performed according to a previously

described method.¹⁸ The CD31 stains were performed on an automated Bond Max immunostainer (Vision BioSystems).

Blood vessel density measurement

The MVD was quantified by analyzing digitalized images of the CD31-stained tissue microarray cores with Olympus Cell B Basic Imaging Software. Microvessel areas were defined as vascular areas delineated by CD31-positive staining, and the MVD was calculated as the sum of all microvessel areas (μ m²) divided by the total area of the core analyzed (μ m²). The MVD values were then grouped in quartiles (first quartile: 0-0.00635; second quartile: 0.00635-0.01047; third quartile: 0.01047-0.01509; fourth quartile: 0.01509-0.08270). The TMAs were independently scored by 2 observers (T.M.C.-S. and L.C.), and discrepancies were resolved by joint review over a double-headed microscope.¹⁸

Construction of the prognostic model

Of the 235 cases, only 125 cases with complete immunohistochemical data were used to form the training set. These 125 cases were compared with the other 110 cases not used in the analysis to assess whether there were any clinical differences between the 2 groups, and none were found (supplemental Table 2). Univariate and multivariate analyses were then performed on the 125 patients. Because all 3 parameters (Choi algorithm, SPARC, and MVD) were previously shown to be significant predictors of survival,^{15,17,18} they were reevaluated in this cohort and used to tally a BPM score. One point was awarded for each adverse prognostic marker: non-GCB subtype, SPARC < 5%, and MVD quartile 4. This BPM was then tested in multivariate analysis after adjusting for the IPI. The BPM was also validated in another multivariate analysis of 74 other patients (validation set) treated with rituximab and CHOP or CHOP-like therapies by the Nebraska Lymphoma Study Group. The immunohistochemical studies of the validation set were scored using tissue microarrays as previously done in the training set. The clinical characteristics of patients in the training and validation sets were also compared for any significant differences.

Statistical analysis

The Kaplan-Meier method was used to estimate overall (OS) and event-free survival (EFS) distributions. Overall survival was defined as the time from initial diagnosis to death from any cause or last contact. Event-free survival was defined as the time from initial diagnosis to the date of progression, relapse, death, or last contact. Patients who were alive and relapse-free at the time of last follow-up were treated as censored. The log-rank test was used to compare the survival distributions. The association between the BPM and certain clinical characteristics including age, sex, performance score, clinical stage, elevated serum lactate dehydrogenase (LDH), number of extranodal sites, IPI score, and response to initial therapy was evaluated by using the χ^2 test or the Fisher exact test for small samples. Comparison of clinical characteristics between the training and the validation sets was evaluated using χ^2 tests. Cox regression analysis was used to compare prognostic factors in multivariate analysis after adjusting for the IPI. Model fit of the Cox regression models was examined using various residual plots, and it was determined that there was no serious lack of fit of the models.

Validation of the BPM was assessed using discrimination and calibration information. Discrimination of the model was measured with the concordance index where, in a randomly selected pair of patients, if the patient with the worse outcome (ie, dies or has the event first) has the worse predicted outcome by the model, then the result is said to be concordant. A random prediction would result in a concordance index of 0.5 and perfect prediction results in an index of 1.0. The concordance index with a 95% confidence interval (CI) is calculated for the both the training and validation sets for OS and EFS using the SAS macro SurvCstD by the method of Kremers.¹⁹ Calibration of the model was assessed by comparing the predicted probability of survival from the training set to the observed probability of survival from the validation set along with 95% CIs. The survival probabilities were compared for both OS and EFS at 1-, 2-, 3-, and

Table 1. Univariate analysis of the three biologic factors and the IPI in the training set of patients with DLBCL

	Overall survival			Event-free survival		
	Hazard ratio	95% CI	P	Hazard ratio	95% CI	P
Choi algorithm						
GCB	1.0		.0036	1.0		.0021
Non-GCB	2.5	1.3-4.9		2.4	1.3-4.1	
SPARC+ cells						
≥ 5 %	1.0		.014	1.0		.041
< 5 %	2.1	1.1-3.9		1.7	1.0-3.0	
Microvascular density						
Quartiles 1-3	1.0		.0013	1.0		.0011
Quartile 4	2.7	1.4-5.0		2.5	1.4-4.3	
IPI score						
Low (0-2)	1.0		.0023	1.0		.011
High (3-5)	2.9	1.5-5.8		2.2	1.2-4.0	

IPI indicates International Prognostic Index; DLBCL, diffuse large B-cell lymphoma; CI, confidence interval; GCB, germinal center B cell–like; and SPARC, secreted protein, acidic, and rich in cysteine.

5-year time points for the combined groups using the biologic prognostic model score. The analysis was conducted with SAS software (SAS Institute Inc). *P* values less than .05 were considered statistically significant.

Results

The training set included 125 patients with complete immunohistochemical data, including 70 (56%) men and 55 (44%) women (supplemental Table 2). The median age of the patients was 62.6 years (range, 22-92 years), and 57 patients (46%) were younger than 60 years of age. At the time of analysis, 83 patients were alive and 42 had died. The median follow-up of the surviving patients is 3.8 years (range, 0.3-11.3 years).

Univariate analysis of the prognostic factors in this cohort showed that the Choi algorithm, SPARC expression, MVD, and the IPI were all significant predictors of OS and EFS (Table 1; Figure 1). Multivariate analysis showed that SPARC, MVD, and the IPI were independent predictors of OS, whereas the Choi algorithm was a borderline predictor (*P* = .056). The Choi algorithm, MVD, and the IPI were also independent predictors of the EFS, whereas SPARC was a borderline predictor (*P* = .068; Table 2).

Because the Choi algorithm, SPARC, and MVD were all shown to be independent predictors of survival, they were used to create a BPM score by awarding 1 point for each adverse prognostic marker; 4 survival curves were generated corresponding to scores of 0, 1, 2, and 3 (Figure 2A-B). The curves were compared to assess the differences in survival between the groups and there was no

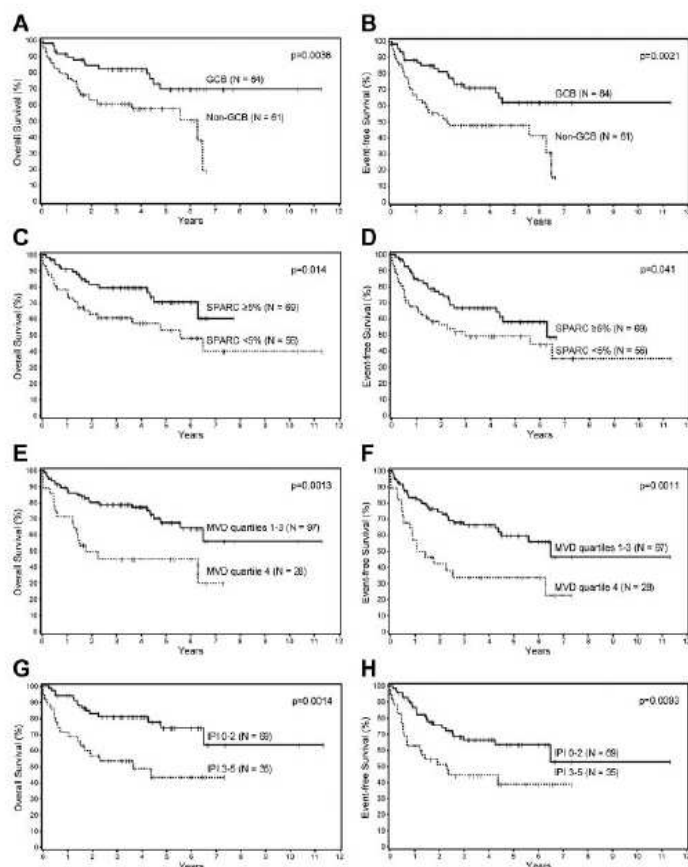


Figure 1. Survival analyses of patients with DLBCL. Overall and event-free survival of patients with DLBCL based on the (A-B) Choi algorithm, (C-D) SPARC expression, (E-F) microvascular density, and the (G-H) IPI.

Table 2. Multivariate analysis of the 3 biologic factors and the IPI in the training set of patients with DLBCL.

	Overall survival			Event-free survival		
	Hazard ratio	95% CI	P	Hazard ratio	95% CI	P
Choi algorithm						
Non-GCB	2.1	1.0-4.4	.056	2.0	1.1-3.9	.033
SPARC⁺ cells						
< 5 %	2.2	1.1-4.5	.03	1.8	1.0-3.2	.068
Microvascular density						
Quartile 4	2.8	1.4-5.8	.0043	2.6	1.4-5.0	.0026
IPI score						
High (3-5)	2.6	1.3-5.2	.0066	2.0	1.1-3.6	.027

IPI indicates International Prognostic Index; DLBCL, diffuse large B-cell lymphoma; CI, confidence interval; GCB, germinal center B-cell-like; and SPARC, secreted protein, acidic, and rich in cysteine.

significant difference in OS or EFS between the 2 groups with low (0, 1) scores ($P = .52$ and $.13$, respectively). The same was true for the 2 groups with high (2, 3) scores ($P = .14$ and $.41$, respectively). Based on these results, 2 prognostic groups were formed, group 0-1 ($n = 75$) and group 2-3 ($n = 50$), and compared to assess whether there were any clinical differences between these 2 groups (Table 3). The only significant difference between the 2 groups was a higher proportion of patients with advanced-stage disease in group 2-3. The new BPM using the 3 factors was highly predictive of OS ($P = .0001$) and EFS ($P < .0001$) in multivariate analysis after adjusting for the IPI (Table 4), and patients with low (0-1) BPM scores had significantly better survival than those with the high (2-3) scores (Figure 2C-D).

The validation set included 74 patients with complete immunohistochemical data. There were 42 (57%) men and 32 (43%) women, and the median age was 63 years (range, 19-89 years). At the time of analysis, 48 patients were alive and 26 had died. The

Table 3. Clinical features of patients with DLBCL in the training set of the biologic prognostic model.

	Group 0-1, N = 75		Group 2-3, N = 50		P
	n	%	n	%	
Male	42	57	27	54	.71
Age, y					
< 60	38	51	19	38	.16
≥ 60	37	49	31	62	
Stage					
I/II	40	56	15	33	.012
III/IV	31	44	31	67	
Missing	4		4		
No. of extranodal sites					
< 2	56	90	34	77	.064
≥ 2	6	10	10	23	
Missing	13		6		
Serum LDH					
Normal	32	49	17	40	.37
Elevated	33	51	25	50	
Missing	10		8		
Performance score					
> 70	60	86	34	74	.11
≤ 70	10	14	12	26	
Missing	5		4		
IPI score					
Low, 0-2	45	73	24	57	.1
High, 3-5	17	27	18	43	
Missing	13		8		
Response to initial therapy					
Complete response	60	88	32	80	.26
Partial response	5	7	2	5	
Stable disease	2	3	4	10	
Progressive disease	1	2	2	5	
Missing	7		10		

DLBCL indicates diffuse large B-cell lymphoma; LDH, lactate dehydrogenase; and IPI, International Prognostic Index.

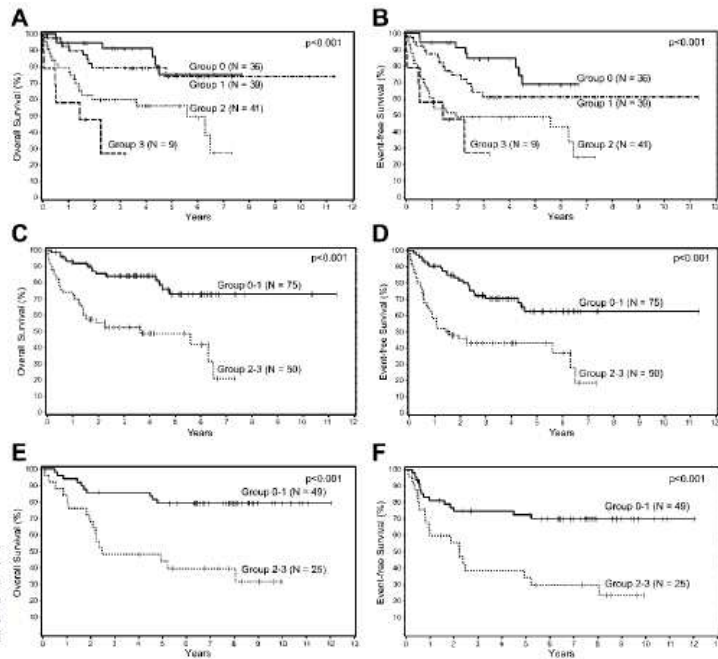


Figure 2. Survival analyses of patients with DLBCL according to biologic prognostic model score. Overall and event-free survival of patients with DLBCL in the training set divided into 4 groups based on the (A-B) biologic prognostic model score, and into 2 groups based on combined scores in the (C-D) training set, and the (E-F) validation set.

Table 4. Multivariate analysis of the BPM in the training and the validation sets of patients with DLBCL

	Overall survival			Event-free survival		
	Hazard ratio	95% CI	P	Hazard ratio	95% CI	P
Training set						
BPM score 2-3	4.3	2.1-9.0	.0001	3.6	1.9-6.6	< .0001
IPI score 3-5	2.7	1.3-5.3	.0052		1.1-3.8	.018
Validation set						
BPM score 2-3	5.2	2.2-12.3	.0002	3.5	1.7-7.4	.0008
IPI score 3-5	3.5	1.6-7.9	.0026	2.6	1.2-5.4	.011

BPM indicates biologic prognostic model; DLBCL, diffuse large B-cell lymphoma; CI, confidence interval; and IPI, International Prognostic Index.

median follow-up of the surviving patients is 7.9 years (range, 1.4-12 years). There were no significant differences in the clinical characteristics of the training and the validation sets. Similar to the training set, the BPM was highly predictive of OS ($P = .0002$) and EFS ($P = .0008$) in multivariate analysis after adjusting for the IPI (Table 4), and patients with low (0-1) BPM scores had significantly better survival than those with the high (2-3) scores (Figure 2E-F).

Patients in the training and validation sets were combined into 1 cohort and then divided into 3 prognostic groups according to IPI scores: low risk (0-1), intermediate risk (2-3), and high risk (4-5). The BPM was highly predictive of OS and EFS in both the low-risk and intermediate-risk IPI groups (Figure 3). This survival analysis was not done for the high-risk IPI group because of the small number of patients ($N = 15$).

The biologic prognostic model validation showed good concordance in both the training and validation datasets. The concordance index for the training set was 0.75 (95% CI: 0.67-0.83) for OS and 0.72 (95% CI: 0.65-0.79) for EFS. The concordance index for the validation set was 0.73 (95% CI: 0.62-0.84) for OS and 0.69 (95% CI: 0.59-0.78) for EFS. Calibration of the data showed excellent agreement between the predicted probability and the observed probability for OS in the 0-1 risk group in the validation set (supplemental Table 3). There was also good agreement between the predicted and observed probability for OS in the 2-3 risk group, with the 95% confidence intervals for the observed probability containing the predicted probabilities. The EFS data also showed good agreement between predicted and observed probabilities for each group at each time point.

Discussion

Diffuse large B-cell lymphoma is a biologically heterogeneous disease which is reflected in the varied response to therapy and survival of individual patients. The IPI is the most widely used prognosticator in DLBCL, yet patients with the same IPI score may have quite different responses to treatment and survival outcomes. Prediction of the outcome of patients with DLBCL is important for multiple reasons including the selection of the best initial therapy, enrollment in clinical trials, and evaluation of novel therapeutic agents.²⁰

Gene expression profiling studies have identified 2 biologic and prognostic subtypes of DLBCL based on the cell of origin, the GCB and ABC subtypes.¹⁰⁻¹² More recently, GEP has also defined 2 prognostic signatures in the tumor microenvironment of DLBCL, stromal-1 and stromal-2.¹⁶ The stromal-1 signature predicts a favorable outcome and reflects extracellular matrix deposition and histiocyte infiltration. In contrast, the stromal-2 signature carries a poor prognosis and reflects angiogenesis and blood vessel density in the tumor stroma. We attempted to reproduce these GEP findings using paraffin-embedded tissue from DLBCL patients treated with standard immunochemotherapy.

In this study, we used data from 3 previously published studies of a cohort of DLBCL patients treated with rituximab and CHOP or CHOP-like regimens.^{15,17,18} Meyer et al¹⁵ classified the cases of DLBCL into GCB and non-GCB subtypes using the Choi algorithm.¹⁴ In a separate study, Meyer et al examined the expression of SPARC in the tumor microenvironment in an attempt to simulate a stromal-1 signature.¹⁷ SPARC is a glycoprotein expressed in a variety of normal cells, including a specific population of macrophages associated with tissue injury or certain tumors.²¹ They found that high SPARC expression by cells in the microenvironment of DLBCL, specifically macrophages and fibroblasts, portends a good prognosis.¹⁷ Concurrently, Cardesa-Salzman et al attempted to simulate the stromal-2 signature in the same cohort of patients by measuring the MVD.¹⁸ They used an antibody against CD31 (PECAM1) to stain the tumor vessels because this was one of the genes included in the stromal-2 signature originally described by Lenz et al.¹⁶ This was the first study in the rituximab era to look at MVD in DLBCL, with high MVD predicting a poor clinical outcome.¹⁸

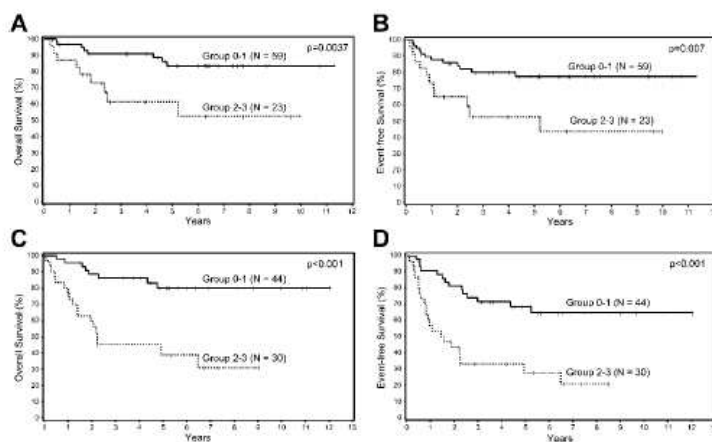


Figure 3. Survival analyses of patients with DLBCL according to biologic prognostic model score in the IPI groups. Overall and event-free survival in the (A-B) low and (C-D) intermediate IPI groups.

One hundred twenty-five patients from this cohort with complete immunohistochemical data were used in our study to form the training set of patients. Univariate analysis of these patients showed that the cell of origin, SPARC expression, MVD, and the IPI were all significant predictors of survival, and multivariate analysis demonstrated that all 4 factors were also independent predictors of survival. Based on these results, we constructed a BPM using the 3 factors derived from immunohistochemistry done on paraffin-embedded tissue. One point was awarded for each adverse prognostic factor (non-GCB subtype, SPARC < 5%, and MVD quartile 4) and survival curves were generated for scores of 0, 1, 2, and 3. Because the curves for scores of 0 and 1 overlapped, and the curves for scores of 2 and 3 also overlapped, they were grouped together, respectively, and 2 prognostic groups were formed: group 0-1 and group 2-3. The BPM was then tested in a multivariate analysis and was found to be highly predictive of both OS and EFS after adjusting for the IPI. We found that patients with a low BPM score (0-1) had a significantly better survival than those with a high BPM score (2-3). The BPM was then validated by multivariate analysis of a separate set of 74 patients, and was again predictive of OS and EFS after adjusting for the IPI. Furthermore, the BPM was highly predictive of OS and EFS in the low-risk (0-1) and intermediate-risk (2-3) IPI groups when the training and validation sets were combined, identifying patients with more aggressive disease within each of these clinical groups.

Multiple individual biomarkers, as well as prognostic models, have been evaluated in patients with DLBCL using different techniques. Some of the models are based on mRNA expression by GEP or by RT-PCR technology, and provide a quantitative measurement of gene expression.²⁰ These techniques are highly accurate and predictive of outcome, but are impractical for routine use because they are expensive, not generally available, and usually require fresh or cryopreserved tumor tissue. However, Malumbres et al²² have created a paraffin-based, 6-gene prognostic model in R-CHOP-treated DLBCL patients using RT-PCR. The genes they used included *LMO2*, *BCL6*, *FNI*, *CCND2*, *SCYA3*, and *BCL2*, and their model divided patients into low- and high-risk groups based on a mortality predictor score that was independent of the IPI. Another study analyzed the expression of 36 genes with the ArrayPlate assay in CHOP- and R-CHOP-treated DLBCL patients using formalin-fixed tissue.²³ The best prognostic model in their study was a 2-variable model using the *MYC* and *HLA-DR* genes. This model was also shown to be complementary to the IPI in stratifying patients with regard to prognosis. Recently, Alizadeh et al proposed a 2-gene model based on the expression of *LMO2* and the tumor microenvironment marker *TNFRSF9* in patients with DLBCL.²⁴ This study used the quantitative real-time PCR and was performed on formalin-fixed tissue. The 2-gene model was an independent predictor of survival in multivariate analysis. However, none of the technologies used in these models are simple to use or commercially available. In contrast, our method using immunohistochemistry performed on paraffin-embedded tissue offers another approach to evaluate the prognosis of DLBCL

patients. Immunostaining is inexpensive, simple to perform, and routine in most clinical laboratories. However, each of these new BPMs will need to be validated in prospective trials in the future. One potential challenge for our model is the use of multiple antibodies with different cutoffs which could lead to increased variability in interobserver scoring. However, with the trend toward personalized therapy of hematolymphoid neoplasms, incorporation of multiple markers to prognostic panels is to be expected.

Our BPM based on tissue immunohistochemistry is the first model in the rituximab era to combine the cell-of-origin and stromal signatures into 1 prognostic score. Although the reproducibility of immunohistochemical stains and algorithms has been questioned in the literature, in our experience, the Choi algorithm and SPARC immunohistochemical stains are easy to score and highly reproducible.^{25,26} Furthermore, we have previously demonstrated the reproducibility of the Choi algorithm.^{14,15} Although microvessel density assessment by image analysis is not currently available in most laboratories, as with all new technologies in medicine, it is critical to evaluate the potential contribution of image analysis in advancing our diagnostic and prognostic capabilities. As image analysis becomes more widely available, pathologists would have the option of performing or outsourcing this ancillary study, as is routinely done with other laboratory tests. Moreover, with the imminent onset of virtual microscopy imaging, access to these analytical tools will inevitably become more widespread in academic and tertiary care institutions. Therefore, in the future, our biologic prognostic model could be used in conjunction with the IPI to stratify patients in clinical trials for novel or risk-adapted therapies.

Acknowledgments

This work was supported by National Cancer Institute grant U01-CA-114778.

Authorship

Contribution: A.M.P. performed immunohistochemical stains, analyzed the results, and wrote the manuscript; T.M.C.-S. and P.N.M. performed immunohistochemical stains and analyzed the results; L.C. and E.C. analyzed the results and contributed cases to the study; L. M. Smith performed the statistical analysis; K.F., T.C.G., J.D., R.D.G., L.R., E.S.J., G.O., A.R., R.M.B., R.T., J. R.C., L. M. Staudt, J.M.C., L.H.S., J.M.V., A.L.-G., and W.C.C. contributed cases and data to the study; D.D.W. designed the study, analyzed the results, and wrote the manuscript; and all coauthors reviewed and contributed to the manuscript.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

Correspondence: Dennis D. Weisenburger, MD, Department of Pathology and Microbiology, 983135 Nebraska Medical Center, Omaha, NE 68198-3135; e-mail: dweisenb@unmc.edu.

References

- Stein H, Warrke RA, Chan WC, et al. Diffuse large B-cell lymphoma, not otherwise specified. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al, eds. *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. Lyon, France: IARC; 2008:233-237.
- Coiffier B, Lepage E, Briere J, et al. CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med*. 2002;346(4):235-242.
- Sehn LH, Donaldson J, Chhanabhai M, et al. Introduction of combined CHOP plus rituximab therapy dramatically improved outcome of diffuse large B-cell lymphoma in British Columbia. *J Clin Oncol*. 2005;23(22):5027-5033.
- Feugier P, Van Hoof A, Sebban C, et al. Long-term results of the R-CHOP study in the treatment of elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma: a study by the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte. *J Clin Oncol*. 2005;23(18):4117-4126.
- Habermann TM, Weller EA, et al. Rituximab-CHOP versus CHOP alone or with maintenance rituximab in older patients with diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol*. 2006;24(19):3121-3127.

6. Fu K, Weisenburger DD, Choi WW, et al. Addition of rituximab to standard chemotherapy improves the survival of both the germinal center B-cell-like and non-germinal center B-cell-like subtypes of diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol*. 2008;26(18):4587-4594.
7. Nyman H, Jerkeman M, Karjalainen-Lindsberg ML, Banham AH, Leppä S. Prognostic impact of activated B-cell focused classification in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with R-CHOP. *Mod Pathol*. 2009;22(8):1094-1101.
8. A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project. *N Engl J Med*. 1993;329(14):987-994.
9. Sehn LH, Berry B, Chhanabhai M, et al. The revised International Prognostic Index (R-IPI) is a better predictor of outcome than the standard IPI for patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *Blood*. 2007;109(5):1857-1861.
10. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*. 2000;403(6769):503-511.
11. Rosenwald A, Wright G, Chan WC, et al. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med*. 2002;346(25):1937-1947.
12. Wright G, Tan B, Rosenwald A, Hurt EH, Wiestner A, Staudt LM. A gene expression-based method to diagnose clinically distinct subgroups of diffuse large B cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(17):9991-9996.
13. Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, et al. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood*. 2004;103(1):275-282.
14. Choi WW, Weisenburger DD, Greiner TC, et al. A new immunostain algorithm classifies diffuse large B-cell lymphoma into molecular subtypes with high accuracy. *Clin Cancer Res*. 2009;15(17):5494-5502.
15. Meyer PN, Fu K, Greiner TC, et al. Immunohistochemical methods for predicting cell of origin and survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab. *J Clin Oncol*. 2011;29(2):200-207.
16. Lenz G, Wright G, Dave SS, et al. Stromal gene signatures in large-B-cell lymphomas. *N Engl J Med*. 2008;359(22):2313-2323.
17. Meyer PN, Fu K, Greiner T, et al. The stromal cell marker SPARC predicts for survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab. *Am J Clin Pathol*. 2011;135(1):54-61.
18. Cardesa-Salzmann TM, Colomo L, Gutiérrez G, et al. High microvessel density determines a poor outcome in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab plus chemotherapy. *Haematologica*. 2011;96(7):996-1001.
19. Kremers WK. Concordance for survival time data: fixed and time-dependent covariates and possible ties in predictor and time. Technical Report Series No. 80. Rochester, MN: Mayo Foundation; 2007.
20. Lossos IS, Morgensztern D. Prognostic biomarkers in diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol*. 2006;24(6):995-1007.
21. Arnold SA, Brekken RA. SPARC: a matricellular regulator of tumorigenesis. *J Cell Commun Signal*. 2009;3(3-4):255-273.
22. Malumbres R, Chen J, Tibshirani R, et al. Paraffin-based 6-gene model predicts outcome in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with R-CHOP. *Blood*. 2008;111(12):5509-5514.
23. Rimsza LM, Leblanc ML, Unger JM, et al. Gene expression predicts overall survival in paraffin-embedded tissues of diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *Blood*. 2008;112(8):9425-9433.
24. Alizadeh AA, Gentles AJ, Alencar AJ, et al. Prediction of survival in diffuse large B-cell lymphoma based on the expression of 2 genes reflecting tumor and microenvironment. *Blood*. 2011;118(5):1350-1358.
25. Salles G, de Jong D, Xie W, et al. Prognostic significance of immunohistochemical biomarkers in diffuse large B-cell lymphoma: a study from the Lunenburg Lymphoma Biomarker Consortium. *Blood*. 2011;117(26):7070-7078.
26. Gutiérrez-García G, Cardesa-Salzmann T, Climent F, et al. Gene-expression profiling and not immunophenotypic algorithms predicts prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with immunochemotherapy. *Blood*. 2011;117(18):4836-4843.

IV_DISCUSIÓN

Los trabajos que integran esta tesis han permitido profundizar en la evaluación y validación mediante estudios inmunohistoquímicos de las “signaturas” estromales obtenidas a partir de los estudios de expresión génica en LDCG.

En el primer trabajo titulado “La densidad de microvasos elevada determina un pronóstico desfavorable en pacientes con LDCG tratados con rituximab más quimioterapia” demostramos que diferencias en la densidad vascular tisular de LDCG guardan una relación consistente con el pronóstico de pacientes tratados con inmunoterapia. Los pacientes con una alta densidad de microvasos presentan una supervivencia libre de progresión y supervivencia global significativamente peores a los pacientes con baja densidad de microvasos a nivel tumoral. Estos resultados fueron evidentes en dos series independientes de LDCG tratados con rituximab más quimioterapia y mantuvieron su valor pronóstico independiente en el análisis multivariante. Una densidad microvascular elevada es capaz de discriminar a pacientes de mal pronóstico de forma independiente al IPI. La posibilidad de identificar a pacientes con un pronóstico significativamente peor por presentar un LDCG altamente vascularizado puede ser útil, dada la existencia de múltiples terapias antiangiogénicas que se están evaluando en el marco de ensayos clínicos.

Una alta densidad de microvasos también se ha descrito como factor pronóstico negativo en pacientes con tumores sólidos, pero hasta ahora no se había descrito como factor pronóstico desfavorable en LDCG tratado con rituximab más quimioterapia. (Mucci 2009) El valor pronóstico de la densidad de microvasos en nuestro estudio está en consonancia con los resultados publicados previamente a partir de estudios de expresión génica. (Lenz 2008)

Las “signaturas” de expresión génica “estromal tipo-1” y “estromal tipo-2”, relacionadas con genes involucrados en la remodelación de la matriz extracelular y en angiogénesis, respectivamente, fueron sinérgicos en predecir supervivencia. Estas dos “signaturas” fueron combinadas en el “score estromal” (resta de “estromal-2” menos “estromal-1”) para predecir supervivencia, siendo predictivos de supervivencia baja los valores elevados del “score estromal”. Un aspecto a destacar es que la densidad de microvasos en nuestro estudio demostró una relación estadísticamente significativa con el “score estromal” pero no con la “signatura” “estromal tipo-2” ni con los niveles de m-RNA de CD31 para cada uno de los casos. El hecho de que no exista relación entre la densidad de microvasos y la “signatura” “estromal tipo-2”, que incluye expresión de CD31, sugiere que la densidad vascular no solo es resultado directo de la expresión elevada de genes relacionados con angiogénesis, sino que refleja una integración de la interrelación existente entre la expresión de genes relacionados con

angiogénesis y de genes de la “signatura” “estromal tipo-1”, implicados en la remodelación de la matriz extracelular, que modula el proceso de neoangiogénesis tumoral. Estos hallazgos refuerzan la hipótesis de que la densidad microvascular es un marcador del “score estromal” en LDCG y puede ayudar a estratificar a estos pacientes de acuerdo a su riesgo biológico relacionado con angiogénesis.

En nuestro estudio, el subtipo ABC, clasificado de acuerdo a resultados de estudios de expresión génica, presentaba una mayor densidad de microvasos que los tumores con un perfil GCG. Estos dos tipos de LDCG difieren en sus mecanismos moleculares patogénicos, con diferencias en sus alteraciones genéticas y en las vías moleculares disreguladas. (Bea 2005) (Davis 2010) (Rosenwald 2002) (Tagawa 2005) El subtipo ABC presenta una activación constitutiva de la vía de NF- κ B, que se asocia con múltiples vías implicadas en angiogénesis, regulando genes como VEGF, IL-8 y múltiples metaloproteinasas. (Huang 2001) (Popov 2006) (Tabruyn 2008) Por ello, la densidad de microvasos más elevada observada en el subtipo ABC es concordante con la relación existente entre la activación de vía de NF κ B en este subtipo y la estimulación de la angiogénesis.

Publicaciones previas han reportado el valor pronóstico de la angiogénesis en LDCG. (Ganjoo 2009) (Gratzinger 2008) En dichos estudios, la densidad microvascular se evaluó de forma semicuantitativa y los marcadores inmunohistoquímicos diferían entre los diferentes estudios. (Jorgensen 2007) (Gratzinger 2008) (Ganjoo 2009) Múltiples publicaciones, aunque con metodologías diferentes, sugieren que tanto la angiogénesis como la linfangiogénesis tienen un papel pronóstico en los linfomas no Hodgkin, incluyendo el LDCG. (Farinha 2010) (Taskinen 2010) (Gratzinger 2008) (Gratzinger 2010) (Pazgal 2007)

En este estudio la evaluación de la angiogénesis en LDCG se realizó mediante un sistema de evaluación de imagen computarizado. La medición de la densidad microvascular está en consonancia con estudios experimentales que demuestran que a nivel funcional la densidad microvascular es más importante que el recuento de vasos totales. (Jain 2003)

Para la tinción inmunohistoquímica de los microvasos se escogió CD31, el factor de adhesión plaquetar PECAM1, uno de los genes incluidos en la signatura estromal que se expresa tanto en el endotelio vascular como linfático, a diferencia de otros marcadores vasculares como CD34 y FVIII, que se expresan predominantemente en el endotelio vascular. (Ilan 2003)

En resumen, basado en los resultados de los estudios de expresión génica y del análisis de microvasos mediante inmunohistoquímica, se puede sugerir que nuevas terapias antiangiogénicas pueden beneficiar a un subgrupo de pacientes con LDCG agresivo, con una alta densidad de microvasos.

En el segundo trabajo, titulado “Nuevo modelo biológico pronóstico basado en inmunohistoquímica que predice supervivencia en pacientes con LDCG”, el objetivo fue reproducir mediante inmunohistoquímica los subtipos biológicos y las “signaturas” estromales de valor pronóstico identificados en estudios de expresión génica. (Alizadeh, 2002) (Lenz 2008). Se usaron datos de tres estudios previamente publicados de cohortes de pacientes con LDCG tratados con R-CHOP. (Meyer 2011) (Meyer 2011) (Cardesa-Salzmann 2011): La predicción de grupo GCB versus ABC de acuerdo a estudios de expresión génica basado en el algoritmo inmunohistoquímico de Choi (Meyer 2011), la expresión de SPARC en el microambiente tumoral como marcador de la signatura estromal tipo-1 y la densidad microvascular como indicador de mal pronóstico asociado a un score elevado de la “signatura” estromal tipo-2.

SPARC es una glicoproteína expresada en una variedad de células normales, incluyendo una población específica de macrófagos asociados a lesión tisular y también presente en algunos tumores. (Arnold 2009) La expresión elevada de SPARC en células del microambiente del LDCG, específicamente en macrófagos y fibroblastos, confiere un pronóstico favorable. En la misma serie de pacientes con LDCG tratados con inmunoterapia se evaluó la densidad microvascular CD31 (+) como marcador de la signatura estromal tipo-2. 125 casos de pacientes con LDCG tratados con R-CHOP se incluyeron como cohorte de entrenamiento. El análisis univariante demostró que la célula de origen, los niveles de expresión de SPARC, la densidad de microvasos así como el IPI fueron todos predictores significativos de supervivencia y el análisis multivariante demostró que los cuatro factores también fueron todos ellos predictores independientes de supervivencia. Basado en los resultados con estos tres elementos, se construyó un modelo de predicción biológica basado en inmunohistoquímica en tejido parafinado. A cada factor pronóstico adverso (subtipo no-GCB, SPARC < 5% y densidad microvascular elevada) se le adjudicó un punto, generando curvas de supervivencia para las puntuaciones 0, 1, 2 y 3. Dado que las curvas de 0 y 1 y de 2 y 3 se sobreponían, se agruparon, quedando dos grupos pronósticos formados por 0-1 y 2-3. Este score fue testado en un análisis multivariante y resultó ser fuertemente predictivo de supervivencia global y libre de eventos tras ajustarse al IPI. Los pacientes con score bajo (0-1) presentan una supervivencia significativamente más alta que aquellos con un score biológico elevado (2-3). Este sistema de puntuación biológico se validó mediante análisis multivariante en una cohorte independiente de 74 pacientes y fue nuevamente predictivo de supervivencia global y libre de enfermedad tras ajustarse al IPI.

Adicionalmente, el sistema de puntuación biológico fue altamente predictivo de supervivencia global y libre de enfermedad en los grupos IPI de bajo riesgo (0-1) y de riesgo intermedio (2-3), identificando a pacientes con enfermedad agresiva dentro de estos grupos clínicos.

Múltiples marcadores pronósticos han sido evaluados en pacientes con LDCG mediante diversas técnicas. Algunos de los modelos se basan en expresión de mRNA mediante estudios de expresión génica o mediante RT-PCR, son altamente fiables para predecir supervivencia, pero son caros, requieren tejido en fresco o criopreservado y no son prácticos para el uso rutinario. Mediante RT-PCR, extrayendo m-RNA de tejido parafinado de LDCG de pacientes tratados con R-CHOP (Malumbres 2008), se ha creado un modelo pronóstico basado en 6 genes (*LMO2*, *BCL6*, *FN1*, *CCND2*, *SCYA3*, y *BCL2*) que divide a los pacientes en grupos de bajo y alto riesgo de forma independiente al IPI. Otro estudio analizó la expresión de 36 genes con un ensayo ArrayPlate en muestras parafinadas de pacientes tratados con CHOP y R-CHOP. (Rimsza 2008) El mejor modelo pronóstico en su estudio fue un modelo con dos variables usando los genes *MYC* y *HLA-DR*, que demostró ser complementario al IPI en la estratificación pronóstica de los pacientes. En otro trabajo se propone un modelo pronóstico basado en la expresión de dos genes (*LMO2* y *TNFRSF9*) (Alizadeh 2011) mediante RT-PCR a partir de tejido parafinado.

No obstante, estos métodos no son universalmente asequibles ni simples.

El modelo predictor biológico basado en inmunohistoquímica ofrece una herramienta barata y simple para evaluar de rutina el pronóstico de los pacientes con LDCG en la mayoría de los laboratorios clínicos. Una potencial dificultad para el uso del modelo predictor biológico es el uso de múltiples anticuerpos con diferentes puntos de corte que podrían conducir a una elevada variabilidad interobservador.

Sin embargo, la incorporación rutinaria de múltiples marcadores pronósticos en la evaluación de los tumores hematopoyéticos es esperable. El modelo pronóstico biológico creado es el primero en incorporar la célula de origen y las “signaturas” estromales. La clasificación de grupos según célula de origen fue validada (Choi 2009), aunque en otras publicaciones más recientes la clasificación de grupos de Choi así como también otras clasificaciones de grupo no se correlacionan de forma adecuada con los resultados de subgrupos basados en estudios de expresión génica (Gutierrez-García, 2011). La evaluación de la densidad de microvasos mediante análisis de imagen no es actualmente una técnica disponible en la mayoría de los laboratorios, aunque el análisis de imagen computarizado se está extendiendo y podría ser más accesible en centros académicos y terciarios un futuro próximo.

Por ello, en el futuro, este modelo pronóstico biológico podría ser usado en conjunción con el IPI para estratificar a pacientes para su inclusión en ensayos clínicos con fármacos nuevos o para tratamientos acordes a su grupo de riesgo.

V_ CONCLUSIONES

1. La densidad de microvasos CD31 (+) en LDCG *de novo* tratados con inmunoterapia tiene valor pronóstico.
 - a. La densidad de microvasos CD31 (+) elevada confiere un peor pronóstico de supervivencia global y de supervivencia libre de eventos.
 - b. Estos resultados mantienen su valor pronóstico independiente al IPI.
 - c. El valor pronóstico de la densidad de microvasos ha sido confirmado en tres series independientes de pacientes con LDCG tratados con rituximab más quimioterapia.
 - d. Los conocimientos obtenidos de estos estudios sugieren un beneficio de tratamientos antiangiogénicos para pacientes con LDCG con alta densidad de microvasos.

2. La densidad de microvasos CD31 (+) en LDCG *de novo* tratados con R-CHOP se correlaciona con el “score estromal” de las “signaturas” de expresión génica.

La densidad de microvasos en nuestro estudio ha demostrado una relación estadísticamente significativa con el “score estromal” pero no con la “signatura” “estromal tipo-2” ni con los niveles de m-RNA de CD31 para cada uno de los casos. El hecho de que no exista relación entre la densidad de microvasos y la “signatura” “estromal tipo- 2”, que incluye expresión de CD31, sugiere que la densidad vascular no solo es resultado directo de la expresión elevada de genes relacionados con angiogénesis, sino que refleja una integración de la interrelación existente entre la expresión de genes relacionados con angiogénesis y de genes de la “signatura” “estromal tipo-1”, implicados en la remodelación de la matriz extracelular, que modula el proceso de neoangiogénesis tumoral. Estos hallazgos refuerzan la hipótesis de que la densidad microvascular es un marcador del “score estromal” en LDCG y puede ayudar a estratificar a estos pacientes de acuerdo a su riesgo biológico.

3. El subtipo ABC, clasificado por estudios de expresión génica, presenta una mayor densidad de microvasos que los tumores con un perfil GCG. La densidad de microvasos más elevada observada en el subtipo ABC concuerda con la relación existente entre la activación de vía de NFkB en este subtipo y la estimulación de la angiogénesis.

4. La medición de la densidad de microvasos CD31 (+) en TMAs de LDCG mediante un sistema de evaluación de imagen computarizado es un método de cuantificación de densidad vascular objetivo para LDCG.
 - a. Los resultados de densidad de microvasos en TMAs de LDCG se correlacionan de forma estadísticamente significativa con la densidad de microvasos en secciones completas de tejidos y también con el “score estromal” de los estudios de expresión génica.
 - b. El valor pronóstico de la densidad de microvasos CD31 (+) evaluado en TMAs mediante un sistema de evaluación de imagen computarizado se ha validado en tres series independientes.

5. El modelo pronóstico biológico, basado en factores pronósticos adversos independientes al IPI (subtipo no-GCB, SPARC < 5% y densidad microvascular elevada), permite identificar mediante inmunohistoquímica a pacientes con enfermedad agresiva dentro de los diferentes grupos clínicos.
 - a. El modelo pronóstico biológico está validado en dos cohortes independientes de pacientes.
 - b. Este modelo predictor ofrece una herramienta barata y simple para evaluar de rutina el pronóstico de los pacientes con LDCG en la mayoría de los laboratorios clínicos. Por ello, en un futuro, este modelo pronóstico biológico podría ser usado en conjunción con el IPI para estratificar a pacientes para su inclusión en ensayos clínicos con fármacos nuevos o para tratamientos acordes a su grupo de riesgo.

VI_ MATERIAL DERIVADO DE LOS TRABAJOS

1. *Publicaciones:*

A) Incluidas en esta tesis

1. Cardesa-Salzmann TM, Colomo L, Gutierrez G, Chan WC, Weisenburger D, Climent F, González-Barca E, Mercadal S, Arenillas L, Serrano S, Tubbs R, Delabie J, Gascoyne RD, Connors JM, Mate JL, Rimsza L, Braziel R, Rosenwald A, Lenz G, Wright G, Jaffe ES, Staudt L, Jares P, López-Guillermo A, Campo E. High microvessel density determines a poor outcome in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab plus chemotherapy. *Haematologica*. 2011 Jul;96(7):996-1001.
2. Perry AM, Cardesa-Salzmann TM*, Meyer PN*, Colomo L, Smith LM, Fu K, Greiner TC, Delabie J, Gascoyne RD, Rimsza L, Jaffe ES, Ott G, Rosenwald A, Braziel RM, Tubbs R, Cook JR, Staudt LM, Connors JM, Sehn LH, Vose JM, López-Guillermo A, Campo E, Chan WC, Weisenburger DD. A new biologic prognostic model based on immunohistochemistry predicts survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 2012 Sep 13; 120(11):2290-6.

**Ambos autores contribuyeron por igual al trabajo*

- Este trabajo mereció un comentario editorial de *Blood*:

Nathwani BN. A promising new biologic prognostic model in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 2012;120 (11):2161-2.

B) Directamente relacionadas con el trabajo de la tesis

3. Gutiérrez-García G, Cardesa-Salzmann T, Climent F, González-Barca E, Mercadal S, Mate JL, Sancho JM, Arenillas L, Serrano S, Escoda L, Martínez S, Valera A, Martínez A, Jares P, Pinyol M, García-Herrera A, Martínez-Trillos A, Giné E, Villamor N, Campo E, Colomo L, López-Guillermo A; Grup per l'Estudi dels Limfomes de Catalunya i Balears (GELCAB). Gene-expression profiling and not immunophenotypic algorithms predicts prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with immunochemotherapy. *Blood*. 2011 May 5; 117(18):4836-43.

4. Valera A, López-Guillermo A, Cardesa-Salzmann T, Climent F, González-Barca E, Mercadal S, Espinosa I, Novelli S, Briones J, Mate JL, Salamero O, Sancho JM, Arenillas L, Serrano S, Erill N, Martínez D, Castillo P, Rovira J, Martínez A, Campo E, Colomo L. MYC protein expression and genetic alterations have prognostic impact in diffuse large B-cell lymphoma treated with immunochemotherapy. *Haematologica*. 2013 May 28. [Epub ahead of print]

2. Abstracts a congresos:

1_Prognostic impact of microvessel density in diffuse large B cell lymphoma. Poster

T Cardesa¹, G Gutiérrez-García¹, F Climent², L Arenillas³, S Serrano³, V Romagosa², E González-Barca², E Campo¹, A López-Guillermo¹ and LI Colomo¹. ¹Hematopathology Unit, Hospital Clínic, Barcelona, Spain; ²Pathology, Hospital de Bellvitge, Barcelona, Spain and ³Hematopathology Unit, Hospital del Mar, Barcelona, Grup Estudi Limfomes Catalunya i Balears (GELCAB), Spain.

USCAP Annual Meeting, Boston, March 7th – 13th, 2009.

2_Clinical utility of four immunohistochemical algorithms to define the germinal center and activated B-cell type origin in diffuse large B-cell lymphomas (DLBCL). Poster

G. Gutiérrez-García, T. Cardesa, L. Colomo, A. Martínez-Trillos, E. González-Barca, S. Mercadal, JM Ribera, A. Salar, L. Escoda, J. Rovira, E. Gainza, N. Villamor, L. Arenillas, A. Martínez-Pozo, E. Campo, y A. López-Guillermo; Grup per l'Estudi dels Limfomes de Catalunya i Balears (GELCAB).

Congreso de la Sociedad Española de Hematología, Las Palmas, 2010.

3_High microvascular density correlates with poor outcome in patients with diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) treated with rituximab plus chemotherapy (R-CT) Poster

Teresa Cardesa¹, Luis Colomo¹, Fina Climent², Eva González-Barca², Gonzalo Gutierrez¹, Santiago Mercadal², Randy D Gascoyne³, Joseph M Connors³, Lisa Rimsza⁴, Rita Braziel⁵, James Cook⁶, Ray Tubbs⁶, Andreas Rosenwald⁷, German Ott⁷, Jose L Mate⁸, Jose M Ribera⁸, Leonor Arenillas⁹, Sergio Serrano⁹, Neus Combalía¹⁰, Jan Delabie¹¹, Georg Lenz¹², Georges Wright¹², Elaine S Jaffe¹², Louis Staudt¹², Wing C Chan¹³, Dennis Weissenburger¹³, Armando Lopez-Guillermo¹, Elias Campo¹. **ASH Annual Meeting. December 5-8th, 2009. New Orleans, USA.**

4_Clinical Impact of MYC, BCL2, BCL6, and MALT1 Alterations in Diffuse Large B-Cell Lymphoma (DLBCL) in the Rituximab (R) Era. Poster

S. Valera¹, T. Cardesa¹, F. Climent², V. Romagosa², E. González², L. Arenillas³, S. Serrano³, J.L. Mate⁴, O. Salamero⁴, A. López-Guillermo¹, E. Campo¹ and L. Colomo¹

USCAP Annual Meeting, Washington, 2010.

VII_ FINANCIACIÓN DE LOS TRABAJOS

1. Beca del Ministerio de Educación y Ciencia de España (SAF 2008 03630-O (EC))
2. FIS PI 070409 (ALG)
3. Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer RTICC U.2006-RET2039-O (EC)
4. National Cancer Institute Grant U01-CA-114778.

VIII_ BIBLIOGRAFÍA

Abubaker J, et al. PIK3CA mutations are mutually exclusive with PTEN loss in diffuse large Bcell lymphoma. *Leukemia*. 2007; 21:2368–2370.

Advani RH, Buggy JJ, Sharman JP, *et al.* Bruton tyrosine kinase inhibitor ibrutinib (PCI-32765) has significant activity in patients with relapsed/refractory B-cell malignancies. *J Clin Oncol* 2013 Jan 1;31:88-94.

Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, *et al.* Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 2000 Feb 3;403:503-511.

Arber DA, George TI. Bone marrow biopsy involvement by non-Hodgkin's lymphoma: frequency of lymphoma types, patterns, blood involvement, and discordance with other sites in 450 specimens. *Am J Surg Pathol* 2005 Dec;29:1549-1557.

Armitage JO, Weisenburger DD. New approach to classifying non-Hodgkin's lymphomas: clinical features of the major histologic subtypes. Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *J Clin Oncol* 1998 Aug;16:2780-2795.

Aukema SM, Siebert R, Schuurin E, *et al.* Double-hit B-cell lymphomas. *Blood* 2011 Feb 24;117:2319-2331.

Barrans S, Crouch S, Smith A, *et al.* Rearrangement of MYC is associated with poor prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated in the era of rituximab. *J Clin Oncol* 2010 Jul 10;28:3360-3365.

Bea S, Colomo L, Lopez-Guillermo A, *et al.* Clinicopathologic significance and prognostic value of chromosomal imbalances in diffuse large B-cell lymphomas. *J Clin Oncol* 2004 Sep 1;22:3498-3506.

Bea S, Zettl A, Wright G, *et al.* Diffuse large B-cell lymphoma subgroups have distinct genetic profiles that influence tumor biology and improve gene-expression-based survival prediction. *Blood* 2005 Nov 1;106:3183-3190.

Bentz M, Barth TF, Bruderlein S, *et al.* Gain of chromosome arm 9p is characteristic of primary mediastinal B-cell lymphoma (MBL): comprehensive molecular cytogenetic analysis and presentation of a novel MBL cell line. *Genes Chromosomes Cancer* 2001 Apr;30:393-401.

Campbell J, Seymour JF, Matthews J, *et al.* The prognostic impact of bone marrow involvement in patients with diffuse large cell lymphoma varies according to the degree of infiltration and presence of discordant marrow involvement. *Eur J Haematol* 2006 Jun;76:473-480.

Ci W, *et al.* The BCL6 transcriptional program features repression of multiple oncogenes in primary B cells and is deregulated in DLBCL. *Blood*. 2009; 113:5536–5548.

Chan WJ. Pathogenesis of diffuse large B cell lymphoma. *Int J Hematol*. 2010; 92:219–230.

Chung R, Lai R, Wei P, *et al.* Concordant but not discordant bone marrow involvement in diffuse large B-cell lymphoma predicts a poor clinical outcome independent of the International Prognostic Index. *Blood* 2007 Aug 15;110:1278-1282.

Compagno M *et al.* Mutations of multiple genes cause deregulation of NFkappaB in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature* 2009; 459:717-721.

de Jong D, Xie W, Rosenwald A, *et al.* Immunohistochemical prognostic markers in diffuse large B-cell lymphoma: validation of tissue microarray as a prerequisite for broad clinical applications (a study from the Lunenburg Lymphoma Biomarker Consortium). *J Clin Pathol* 2009 Feb;62:128-138.

Davis RE, *et al.* Chronic active B-cell-receptor signalling in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature*. 2010; 463:88–92.

Dunleavy K, Pittaluga S, Czuczman MS, *et al.* Differential efficacy of bortezomib plus chemotherapy within molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2009 Jun 11;113:6069-6076.

Friedberg JW, Sharman J, Sweetenham J, *et al.* Inhibition of Syk with fostamatinib disodium has significant clinical activity in non-Hodgkin lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2010 Apr 1;115:2578-2585.

Friedberg JW. Double-hit diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 2012 Oct 1;30:3439-3443.

Gang AO, Strom C, Pedersen M, *et al.* R-CHOEP-14 improves overall survival in young high-risk patients with diffuse large B-cell lymphoma compared with R-CHOP-14. A population-based investigation from the Danish Lymphoma Group. *Ann Oncol* 2012 Jan;23:147-153.

Gisselbrecht C, Glass B, Mounier N, *et al.* Salvage regimens with autologous transplantation for relapsed large B-cell lymphoma in the rituximab era. *J Clin Oncol* 2010 Sep 20;28:4184-4190.

Gisselbrecht C. Is there any role for transplantation in the rituximab era for diffuse large B-cell lymphoma? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2012;2012:410-416.

Green MR, *et al.* Integrative analysis reveals selective 9p24.1 amplification, increased PD-1 ligand expression, and further induction via JAK2 in nodular sclerosing Hodgkin lymphoma and primary mediastinal large B-cell lymphoma. *Blood*. 2010; 116:3268–3277.

Gutierrez-Garcia G, Cardesa-Salzmann T, Climent F, *et al.* Gene-expression profiling and not immunophenotypic algorithms predicts prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with immunochemotherapy. *Blood* 2011 May 5;117:4836-4843.

Harris NL, Jaffe ES, Stein H, *et al.* A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood* 1994 Sep 1;84:1361-1392.

Hernandez-Ilizaliturri FJ, Deeb G, Zinzani PL, *et al.* Higher response to lenalidomide in relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma in nongerminal center B-cell-like than in germinal center B-cell-like phenotype. *Cancer* 2011 Nov 15;117:5058-5066.

Huang JZ, Sanger WG, Greiner TC, *et al.* The t(14;18) defines a unique subset of diffuse large B-cell lymphoma with a germinal center B-cell gene expression profile. *Blood* 2002 Apr 1;99:2285-2290.

Hummel M, Anagnostopoulos I, Korbjuhn P, *et al.* Epstein-Barr virus in B-cell non-Hodgkin's lymphomas: unexpected infection patterns and different infection incidence in low- and high-grade types. *J Pathol* 1995 Mar;175:263-271.

Iqbal J, Neppalli VT, Wright G, *et al.* BCL2 expression is a prognostic marker for the activated B-cell-like type of diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 2006 Feb 20;24:961-968.

Iqbal J, *et al.* Distinctive patterns of BCL6 molecular alterations and their functional consequences in different subgroups of diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia*. 2007; 21:2332–2343.

Iqbal J, Meyer PN, Smith LM, *et al.* BCL2 predicts survival in germinal center B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma treated with CHOP-like therapy and rituximab. *Clin Cancer Res* 2011 Dec 15;17:7785-7795.

Iwasaki A, Medzhitov R. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science*.2010; 327:291–295.

Johnson NA, Slack GW, Savage KJ, *et al.* Concurrent expression of MYC and BCL2 in diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone. *J Clin Oncol* 2012 Oct 1;30:3452-3459.

Joos S, Otano-Joos MI, Ziegler S, *et al.* Primary mediastinal (thymic) B-cell lymphoma is characterized by gains of chromosomal material including 9p and amplification of the REL gene. *Blood* 1996 Feb 15;87:1571-1578.

Kahl BS, Cheson BD, Friedberg JW. Clinical Roundtable Monograph: current treatment options for NHL patients refractory to standard therapy: recent data in single-agent and combination therapy. *Clin Adv Hematol Oncol* 2010 May;8:1-16.

Klein U, *et al.* Transcription factor IRF4 controls plasma cell differentiation and class-switch recombination. *Nat Immunol.* 2006; 7:773–782

Kramer MH, *et al.* Clinical relevance of BCL2, BCL6, and MYC rearrangements in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood.* 1998; 92:3152–3162.

Ladanyi M, Offit K, Jhanwar SC, Filippa DA, Chaganti RS. MYC rearrangement and translocations involving band 8q24 in diffuse large cell lymphomas. *Blood.* 1991; 77:1057–1063

Lenz G, *et al.* Oncogenic CARD11 mutations in human diffuse large B cell lymphoma. *Science.* 2008; 319:1676–1679.

Lenz G, Wright G, Dave SS, *et al.* Stromal gene signatures in large-B-cell lymphomas. *N Engl J Med* 2008 Nov 27;359:2313-2323.

Lenz G, Wright GW, Emre NC, *et al.* Molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma arise by distinct genetic pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008 Sep 9;105:13520-13525.

Lin SC, Lo YC, Wu H. Helical assembly in the MyD88-IRAK4-IRAK2 complex in TLR/IL-1R signalling. *Nature.* 2010; 465:885–890.

Loddenkemper C, Anagnostopoulos I, Hummel M, *et al.* Differential Emu enhancer activity and expression of BOB.1/OBF.1, Oct2, PU.1, and immunoglobulin in reactive B-cell populations, B-cell non-Hodgkin lymphomas, and Hodgkin lymphomas. *J Pathol* 2004 Jan;202:60-69.

Lohr J, Stojanov P *et al.* Discovery and prioritization of somatic mutations in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) by whole-exome sequencing. *PNAS* 2012; 109 (10): 3879-3884.

Lossos IS, *et al.* Ongoing immunoglobulin somatic mutation in germinal center B cell-like but not in activated B cell-like diffuse large cell lymphomas. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000; 97:10209–10213.

Mandelbaum J, *et al.* BLIMP1 is a tumor suppressor gene frequently disrupted in activated B cell like diffuse large B cell lymphoma. *Cancer Cell.* 2010; 18:568–579.

Matolcsy A, Chadburn A, Knowles DM. De novo CD5-positive and Richter's syndrome-associated diffuse large B cell lymphomas are genotypically distinct. *Am J Pathol* 1995 Jul;147:207-216.

Maurer MJ, Micallef IN, Cerhan JR, *et al.* Elevated serum free light chains are associated with event-free and overall survival in two independent cohorts of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 2011 Apr 20;29:1620-1626.

Mendez-Lago M. Mutations In MLL2 and MEF2B Genes In Follicular Lymphoma and Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Blood.* 2010; 116:211.

Miller TP, Grogan TM, Dahlberg S, *et al.* Prognostic significance of the Ki-67-associated proliferative antigen in aggressive non-Hodgkin's lymphomas: a prospective Southwest Oncology Group trial. *Blood* 1994 Mar 15;83:1460-1466.

Morin RD, *et al.* Somatic mutations altering EZH2 (Tyr641) in follicular and diffuse large B-cell lymphomas of germinal-center origin. *Nat Genet.* 2010; 42:181–185.

Morin RD *et al.* Frequent mutation of histone-modifying genes in non-Hodgkin lymphoma. *Nature.* 2011 Jul 27;476(7360):298-303.

Mounier N, Briere J, Gisselbrecht C, *et al.* Estimating the impact of rituximab on bcl-2-associated resistance to CHOP in elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Haematologica* 2006 May;91:715-716.

Mounier N, Briere J, Gisselbrecht C, *et al.* Estimating the impact of rituximab on bcl-2-associated resistance to CHOP in elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Haematologica* 2006 May;91:715-716.

Muller C, Murawski N, Wiesen MH, *et al.* The role of sex and weight on rituximab clearance and serum elimination half-life in elderly patients with DLBCL. *Blood* 2012 Apr 5;119:3276-3284.

Nabhan C, Mehta J. Diffuse large B-cell lymphoma: is there a place for autologous hematopoietic stem cell transplant in first remission in the era of chemo-immunotherapy? *Leuk Lymphoma* 2012 Oct;53:1859-1866.

Ngo VN, *et al.* Oncogenically active MYD88 mutations in human lymphoma. *Nature*. 2011; 470:115–119.

Niu H, Ye BH, Dalla-Favera R. Antigen receptor signaling induces MAP kinase-mediated phosphorylation and degradation of the BCL-6 transcription factor. *Genes Dev*. 1998; 12:1953–1961

Palanisamy N, bou-Elella AA, Chaganti SR, *et al.* Similar patterns of genomic alterations characterize primary mediastinal large-B-cell lymphoma and diffuse large-B-cell lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2002 Feb;33:114-122.

Park S, Lee J, Ko YH, *et al.* The impact of Epstein-Barr virus status on clinical outcome in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2007 Aug 1;110:972-978.

Pasqualucci L, Neumeister P, Goossens T, *et al.* Hypermutation of multiple proto-oncogenes in B-cell diffuse large-cell lymphomas. *Nature* 2001 Jul 19;412:341-346.

Pasqualucci L, *et al.* Inactivation of the PRDM1/BLIMP1 gene in diffuse large B cell lymphoma. *J Exp Med*. 2006; 203:311–317.

Pasqualucci L *et al.* Analysis of the Coding Genome of Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Nat Genet* 2011. ; 43(9): 830–837.

Pfreundschuh M, Ho AD, Cavallin-Stahl E, *et al.* Prognostic significance of maximum tumour (bulk) diameter in young patients with good-prognosis diffuse large-B-cell lymphoma treated with CHOP-like chemotherapy with or without rituximab: an exploratory analysis of the MabThera International Trial Group (MINT) study. *Lancet Oncol* 2008 May;9:435-444.

Piris M, Brown DC, Gatter KC, *et al.* CD30 expression in non-Hodgkin's lymphoma. *Histopathology* 1990 Sep;17:211-218.

Rawlings DJ, Sommer K, Moreno-Garcia ME. The CARMA1 signalosome links the signalling machinery of adaptive and innate immunity in lymphocytes. *Nat Rev Immunol.* 2006; 6:799–812.

Rosenwald A, Staudt LM. Gene expression profiling of diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2003;44 Suppl 3:S41-S47.

Rui L, *et al.* Cooperative epigenetic modulation by cancer amplicon genes. *Cancer Cell.* 2010; 18:590–605.

Saito M, *et al.* A signaling pathway mediating downregulation of BCL6 in germinal center B cells is blocked by BCL6 gene alterations in B cell lymphoma. *Cancer Cell.* 2007; 12:280–292.

Saito M, *et al.* BCL6 suppression of BCL2 via Miz1 and its disruption in diffuse large B cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009; 106:11294–11299

Salles G, de JD, Xie W, *et al.* Prognostic significance of immunohistochemical biomarkers in diffuse large B-cell lymphoma: a study from the Lunenburg Lymphoma Biomarker Consortium. *Blood* 2011 Jun 30;117:7070-7078.

Savage KJ, Johnson NA, Ben-Neriah S, *et al.* MYC gene rearrangements are associated with a poor prognosis in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with R-CHOP chemotherapy. *Blood* 2009 Oct 22;114:3533-3537.

Sehn LH, Berry B, Chhanabhai M, *et al.* The revised International Prognostic Index (R-IPI) is a better predictor of outcome than the standard IPI for patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *Blood* 2007 Mar 1;109:1857-1861.

Sehn LH, Scott DW, Chhanabhai M, *et al.* Impact of concordant and discordant bone marrow involvement on outcome in diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *J Clin Oncol* 2011 Apr 10;29:1452-1457.

Schneider *et al.* Molecular pathogenesis of diffuse large B-cell lymphoma. *Semin Diagn Pathol*. 2011 May ; 28(2): 167–177.

Shaffer AL, *et al.* BCL-6 represses genes that function in lymphocyte differentiation, inflammation, and cell cycle control. *Immunity*. 2000; 13:199–212.

Shipp MA. Molecular signatures define new rational treatment targets in large B-cell lymphomas. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2007;265-269.

Steidl C, *et al.* MHC class II transactivator CIITA is a recurrent gene fusion partner in lymphoid cancers. *Nature*. 2011; 471:377–381.

Stopeck AT, Unger JM, Rimsza LM, *et al.* A phase II trial of single agent bevacizumab in patients with relapsed, aggressive non-Hodgkin lymphoma: Southwest oncology group study S0108. *Leuk Lymphoma* 2009 May;50:728-735.

Tunaypin C, *et al.* Direct repression of *prdm1* by Bcl-6 inhibits plasmacytic differentiation. *J Immunol*. 2004; 173:1158–1165.

Valera A, López-Guillermo A, Cardesa-Salman T *et al.* MYC protein expression and genetic alterations have prognostic impact in diffuse large B-cell lymphoma treated with immunochemotherapy. *Haematologica* 2013, epub ahead of print.

Xiao C, *et al.* Lymphoproliferative disease and autoimmunity in mice with increased miR-17-92 expression in lymphocytes. *Nat Immunol*. 2008; 9:405–414.

Yap DB, *et al.* Somatic mutations at EZH2 Y641 act dominantly through a mechanism of selectively altered PRC2 catalytic activity, to increase H3K27 trimethylation. *Blood*. 2011; 117:2451–2459.

Tabla 1	
Subtipos de LDCG	
	LDCG rico en células T/histiocitos
	LDCG primario del SNC
	LDCG primario cutáneo de extremidades
	LDCG EBV positivo de los ancianos
Variantes morfológicas comunes	
	Centroblástico
	Inmunoblástico
	Anaplásico
Subgrupos inmunohistoquímicos	
	LDCG CD5(+)
	LDCG tipo célula B del centro germinal (GCB)
	LDCG no-GCB
Subgrupos moleculares	
	LDCG tipo célula B del centro germinal (GCB)
	LDCG tipo célula B activada (ABC)

Tabla 2**Nuevos agentes biológicos en LDCG con su mecanismo de acción y subgrupo de acción preferencial**

Fármaco	Mecanismo de acción	Subgrupo de acción preferencial
Bortezomib	NF-kB	ABC
Fostamatinib	Syk	ABC
Ibrutinib (PCI-32765)	BTK	ABC
Cal-101	PI3K	ABC
Enzastaurin	PKC	ABC
Navitoclax (ABT-263) and ABT-737	Bcl2	GCB
EZH2 inhibitors	EZH2	GCB
Bevacizumab	VEGF	Estromal-2
Lenalidomide	Angiogenesis, NF-kB	Estromal-2, ABC

Tabla 3**Factores pronósticos moleculares en pacientes tratados con R-CHOP**

Marcador molecular	Impacto pronóstico
BCL2	Adverso (LDCG tipo GCB)
MYC	Adverso (en conjunción con BCL2)
LMO2	Favorable
p53 mutado	Adverso
VEGFR2	Adverso
HIF-1	Favorable
Ki-67	Adverso
p21	Favorable
Densidad de microvasos elevada	Adverso
CD5	Adverso