



Universitat
de les Illes Balears

TESIS DOCTORAL

2019

**ANÁLISIS DE FACTORES PRONÓSTICOS CLÍNICOS Y
BIOLÓGICOS EN EL LINFOMA DIFUSO DE CÉLULA
GRANDE B TRATADO CON R-CHOP CON O SIN
RADIOTERAPIA**

LEYRE BENTO DE MIGUEL



Universitat
de les Illes Balears



TESIS DOCTORAL

2019

PROGRAMA DEL DOCTORADO:

Investigación Traslacional en Salud Pública y Enfermedades de Alta Prevalencia

ANÁLISIS DE FACTORES PRONÓSTICOS CLÍNICOS Y BIOLÓGICOS EN EL LINFOMA DIFUSO DE CÉLULA GRANDE B TRATADO CON R-CHOP CON O SIN RADIOTERAPIA

LEYRE BENTO DE MIGUEL

Director: Antonio Gutiérrez García

Tutor: Borja García-Cosío Piqueras

Doctora por la Universitat de les Illes Balears

“Ser, en verdad, un gran médico es el amor invariable al que sufre y la generosidad en la prestación de la ciencia, que han de brotar en cada minuto sin esfuerzo, naturalmente, como el agua del manantial...

...con la idea clavada en el corazón de que trabajamos con instrumentos imperfectos y con medios de utilidad insegura, pero con la conciencia cierta de que hasta donde no puede llegar el saber, llega siempre el amor”

(Gregorio Marañón)

Agradecimientos

Han sido muchas las personas que han estado dándome apoyo moral y fuerza en el transcurso de la elaboración de esta tesis tanto mi familia y amigos de Pamplona como la familia mallorquina que he creado en estos años.

Pero me gustaría especialmente dedicar la tesis a mis padres, de los que me siento muy orgullosa, por su apoyo incondicional, su sabiduría, generosidad y bondad que me han hecho ser la persona que soy.

Quería dar las gracias a Silvia Montoto por haber sido una figura clave en el inicio de mi carrera profesional, haber confiado en mí y contado conmigo en todo momento.

Quiero agradecer a Antonio Gutiérrez, mi director de tesis y compañero incondicional en el mundo de los linfomas, por haberme transmitido su ilusión, constancia y dedicación por la investigación, una heroicidad con el ritmo de trabajo al que estamos sometidos. Asimismo, quería dar las gracias a Antonia Sampol como Jefa de Servicio por todo el apoyo y soporte en estos años, así como a mis compañeros del Servicio de Hematología.

Finalmente, quería agradecer también enormemente al GELTAMO su aportación en la elaboración del presente trabajo.

Índice

Abreviaturas.....	6
Resumen.....	8
Introducción.....	15
Características generales	16
Tratamiento estándar.....	18
Factores pronósticos en LBDCG	19
1) Clásicos	19
2) Dosis intensidad relativa	20
3) Mejoras de los índices pronósticos	21
4) Papel pronóstico de variables del hemograma	22
5) Papel de la vitamina D.....	24
6) Papel de las pruebas de imagen	25
7) Factores moleculares y traslacionales conocidos	25
Hipótesis y objetivos.....	37
Material y métodos	40
Resultados	46
Dosis intensidad relativa (Anexo1)	47
Validación del TS.....	54
Inclusión de las variables del hemograma en un nuevo índice pronóstico	60
Papel pronóstico de los miRNAs en el LBDCG	66
Discusión.....	76
Dosis intensidad relativa	77
Comparación de los nuevos índices con los índices estándar.....	80
Papel pronóstico de los miRNAs en LBDCG	84
Conclusiones.....	89
Bibliografía.....	91
Anexos	116

Abreviaturas

LBDCG: Linfoma B difuso de célula grande

LNH: Linfoma no Hodgkin

WHO: World Health Organization

NOS: No especificado

SNC: Sistema nervioso central

VEB: Virus Epstein Barr

CG: Centrogerminal

ABC: Célula B activada

R-CHOP: Rituximab, Ciclofosfamida, Doxorubicina, Vincristina y Prednisona

IPI: International Prognostic Index

LDH: Lactato deshidrogenasa

ECOG: Eastern Cooperative Oncology Group

PS: Performance Status

AA: Ann Arbor

TS: Tumor Score

B2M: Beta-2microglobulina

SLP: Supervivencia libre de progresión

SG: Supervivencia global

SLF: Supervivencia libre de fallo

HR: Hazard ratio

IC: Intervalo de confianza

RR: Riesgo relativo

DIR: Dosis intensidad relativa

DI: Dosis intensidad

NCCN: National Comprehensive Cancer Network

RAL: Recuento absoluto de linfocitos

RAM: Recuento absoluto de monocitos

RAN: Recuento absoluto de neutrófilos

RDW: Amplitud de la distribución eritrocitaria

TC: Tomografía computarizada

PET: Tomografía por emisión de positrones

VMT: Volumen metabólico tumoral

SUVmáx: Valor estandarizado de captación máximo

IHQ: Inmunohistoquímica

DH: Doble hit

DE: Doble expresor

miRNAs: microRNAs

HUSE: Hospital Universitario Son Espases

HSLL: Hospital Son Llàtzer

HM: Hospital del Mar

GELTAMO: Grupo Español de Linfomas y Trasplante Autólogo

MInT: MabThera International Trial

Resumen

El linfoma B difuso de célula grande (LBDCG) constituye un grupo heterogéneo de linfomas desde el punto de vista biológico y clínico. En torno al 20-40% de los pacientes recaen por lo que es importante buscar marcadores pronósticos para tratar de forma diferencial aquellos casos menos susceptibles de ser curados con tratamiento convencional. Con este propósito, hemos estudiado distintos marcadores pronósticos en una serie homogéneamente tratada con R-CHOP con o sin radioterapia para evaluar su capacidad de influir en nuestras decisiones de manejo terapéutico.

Desde el punto de vista de los factores relacionados con el tratamiento, la dosis intensidad relativa (DIR) es ampliamente conocida en linfoma Hodgkin pero hay menos evidencias en LBDCG. Mediante este trabajo analizamos la DIR tanto en una cohorte tratada con R-CHOP21 como con R-CHOP14. En nuestra serie no encontramos diferencias en términos de respuesta y supervivencia entre los pacientes tratados con R-CHOP21 o R-CHOP14, lo cual coincide con lo reportado en los ensayos fase III. Se observó una tendencia a una mayor tasa de reducción de DIR en el grupo de R-CHOP14. Sin embargo, el impacto de la reducción de la DIR en la respuesta y supervivencia se observó únicamente en el grupo de R-CHOP21. Por tanto, si evitáramos la reducción de la DIR, los regímenes de R-CHOP21 y R-CHOP14 serían equivalentes en términos de respuesta y supervivencia. En pacientes tratados con R-CHOP21 se recomiendan, por tanto, medidas de soporte para evitar estas reducciones.

Desde el punto de vista de factores clínicos, se han propuesto numerosos índices pronósticos. El más importante y mayormente usado es el índice pronóstico internacional (IPI), posteriormente validado en la era de Rituximab (R-IPI). Sin embargo, el R-IPI a pesar de ser un buen índice, carece de la habilidad de identificar un grupo de muy alto riesgo en la era de Rituximab: el grupo de alto riesgo del R-IPI tiene una supervivencia global (SG) y supervivencia libre de progresión (SLP) a los 4 años mayor del 50%. En los últimos años, se han hecho esfuerzos para intentar mejorar la habilidad discriminativa del IPI, como el NCCN-IPI. En la era pre-Rituximab también se generó el Tumor Score (TS) considerando exclusivamente variables relacionadas con el tumor. En el presente trabajo, se realizó la validación del TS en la era de Rituximab y se confirmó que todas las variables incluidas en el TS original mantenían un papel pronóstico independiente. Asimismo, el TS demostró una mejor identificación de los pacientes de alto riesgo en comparación con el IPI o el NCCN-IPI.

Por otra parte, generamos por primera vez un nuevo índice pronóstico con la inclusión de variables del hemograma (ratio linfocitos/monocitos y amplitud de la distribución

eritrocitaria) y la beta-2-microglobulina al diagnóstico que es de fácil obtención en la práctica clínica. En comparación con el R-IPI, este nuevo índice demostró una mejor identificación del subgrupo de muy mal pronóstico tanto para SLP como para SG. Asimismo, con este nuevo índice se confirmó un mejor poder discriminativo tanto para SLP como SG.

Por último, desde el punto de vista biológico, estudios previos sugieren que los microRNAs (miRNAs) podrían tener un potencial papel pronóstico en pacientes con linfoma. Nosotros identificamos 3 miRNAs (miRNA-1244, miRNA-193-5p y miRNA-1231) con papel pronóstico tanto para SLP como para SG. Estos pacientes podrían ser susceptibles de ser tratados con mayor o menor intensidad o con la adición de nuevos fármacos.

Diffuse large B cell lymphoma (DLBCL) is a heterogeneous subtype from a biological and clinical point of view. Around 20-40% of the patient's relapse, so it is important to identify a high-risk population that could benefit from different therapeutic approaches. For this purpose, we have analyzed different prognostic markers in a series homogeneously treated with R-CHOP with or without radiotherapy to evaluate their capacity to influence our therapeutic decisions.

Regarding factors related to the treatment, the relative dose intensity (RDI) is a well-known prognostic factor in Hodgkin lymphoma, but scarce information has been published in DLBCL. Our study analyzed the prognostic impact of RDI in two cohorts of DLBCL patients treated with R-CHOP21 or R-CHOP14 to evaluate its differential impact when increasing dose density. In our series there were no differences in terms of response or survival between patients treated with R-CHOP21 or R-CHOP14, which coincides with reported phase III clinical trials. A higher rate of RDI reduction was observed in the R-CHOP14 group. However, the impact of RDI reductions on response and survival was only observed in the R-CHOP21. We can conclude that R-CHOP21 and R-CHOP14 are equivalent regimens in terms of response and survival only if RDI reductions are avoided. For patients receiving R-CHOP21 we recommend using clinical and support measures in order to avoid RDI reductions.

Regarding clinical factors, several scores have been developed. The International Prognostic Index (IPI), lately validated in the rituximab era (R-IPI), has been the most widely used. However, despite being a good prognostic score, it cannot identify a very high-risk subset in the Rituximab era: the high-risk group of R-IPI has a 4-year overall survival (OS) and progression free survival (PFS) higher than 50%. Several attempts have been made to try to improve R-IPI such as the NCCN-IPI. Also, in pre-Rituximab era the Tumor Score (TS) was reported exclusively considering tumor-related variables. In our study, the validation of TS was performed and we confirmed that all variables included in the original TS retain an independent prognostic role. Likewise, TS showed a better identification of patients with high risk prognosis compared to IPI or NCCN-IPI.

On the other hand, a new prognosis score including complete blood count variables (lymphocytes/monocytes ratio and red blood cell distribution width) and beta-2-microglobulin at diagnosis is presented for the first time, which is readily available in a real-life practice without additional tests. Compared to R-IPI, this score showed better high-risk assessment for both PFS and OS. Furthermore, better risk discrimination for PFS and OS was confirmed with the new score compared to IPI.

Finally, regarding biological factors, previous studies suggest that microRNAs (miRNAs) could have a potential prognostic role in patients with lymphoma. We identified 3 miRNAs (miRNA-1244, miRNA-193-5p and miRNA-1231) with prognostic significance for PFS and OS. These patients could be susceptible to be treated with more or less intensity or with the addition of new drugs.

El limfoma B difús de cèl·lula gran (LBDCG) constitueix un grup heterogeni de limfomes des del punt de vista biològic i clínic. Al voltant del 20-40% dels pacients recauen, per la qual cosa, és important buscar marcadors pronòstics per tractar de forma diferencial aquells casos menys susceptibles de ser curats amb tractament convencional. Amb aquest propòsit, hem estudiat diferents marcadors pronòstics en una sèrie homogèniament tractada amb R-CHOP amb o sense radioteràpia per avaluar la seva capacitat d'influir en les nostres decisions de maneig terapèutic.

Des del punt de vista dels factors relacionats amb el tractament, la dosi intensitat relativa (DIR) és àmpliament coneguda en limfoma Hodgkin però hi ha menys evidències en LBDCG. Mitjançant aquest treball analitzem la DIR tant en una cohort tractada amb R-CHOP21 com amb R-CHOP14. En la nostra sèrie no trobem diferències en termes de resposta i supervivència entre els pacients tractats amb R-CHOP21 o R-CHOP14, la qual cosa coincideix amb el reportat en els assajos fase III. Es va observar una tendència a una major taxa de reducció de DIR en el grup de R-CHOP14. No obstant, l'impacte de la reducció de la DIR en la resposta i supervivència es va observar únicament en el grup de R-CHOP21. Per tant, si evitéssim la reducció de la DIR, els règims de R-CHOP21 i R-CHOP14 serien equivalents en termes de resposta i supervivència. En pacients tractats amb R-CHOP21 es recomana, per tant, mesures de suport per evitar aquestes reduccions.

Des del punt de vista de factors clínics, s'han proposat nombrosos índexs pronòstics. El més important i majorment utilitzat és l'índex pronòstic internacional (IPI), posteriorment validat en l'era de Rituximab (R-IPI). No obstant, l'R-IPI tot i ser un bon índex, manca de l'habilitat d'identificar un grup de molt alt risc en l'era de Rituximab: el grup d'alt risc de l'R-IPI té una supervivència global (SG) i supervivència lliure de progressió (SLP) als 4 anys major del 50%. En els últims anys, s'han fet esforços per intentar millorar l'habilitat discriminativa de l'IPI, com l'NCCN-IPI. En l'era pre-Rituximab també es va generar el Tumor Score (TS) considerant exclusivament variables relacionades amb el tumor. Al present treball, es va realitzar la validació del TS en l'era de Rituximab i es va confirmar que totes les variables incloses en el TS original mantenien un paper pronòstic independent. Així mateix, el TS va demostrar una millor identificació dels pacients d'alt risc en comparació amb l'IPI o l'NCCN-IPI.

D'altra banda, generem per primera vegada un nou índex pronòstic amb la inclusió de variables de l'hemograma (ràtio limfòcits/monòcits i amplitud de la distribució eritrocitària) i la beta-2-microglobulina al diagnòstic que és de fàcil obtenció en la pràctica clínica. En comparació amb l'R-IPI, aquest nou índex va demostrar una millor

identificació del subgrup de molt mal pronòstic tant per SLP com per SG. Així mateix, amb aquest nou índex es va confirmar un millor poder discriminatiu tant per SLP com SG.

Finalment, des del punt de vista biològic, estudis previs suggereixen que els microRNAs (miRNAs) podrien tenir un potencial paper pronòstic en pacients amb limfoma. Nosaltres identifiquem 3 miRNAs (miRNA-1244, miRNA-193-5p i miRNA-1231) amb paper pronòstic tant per SLP com per SG. Aquest pacients podrien ser susceptibles de ser tractats amb major o menor intensitat o amb l'addició de nous fàrmacs.

Introducción

Características generales

El linfoma B difuso de célula grande (LBDCG) es el subtipo de linfomas no Hodgkin (LNH) más frecuente y engloba 30-40% de todos los LNH. Es más frecuente en población mayor, la mediana de edad se encuentra en la séptima década de la vida, aunque puede presentarse también en la infancia y en adultos jóvenes. Es más frecuente en varones que en mujeres.

Constituye un grupo heterogéneo desde el punto de vista tanto biológico como clínico que se refleja en la nueva clasificación de la World Health Organization (WHO) 2016 con más de 20 subgrupos basados en parámetros morfológicos, biológicos, inmunofenotípicos y clínicos(1):

LBDCG tipo no especificado (NOS) Variante morfológica: Centroblastica Inmunoblastica Anaplásica Otras Subtipos moleculares: Subtipo centrogerminal Subtipo célula B activada
Otros linfomas de célula B grande Linfoma B rico en células T/histiocitos LBDCG primario del sistema nervioso central (SNC) LBDCG primario cutáneo de tipo las piernas LBDCG virus epstein bar (VEB) positivo, NOS LBDCG asociado a inflamación crónica Granulomatosis linfomatoide LBDCG con reordenamiento de IRF4 Linfoma primario mediastínico LBDCG intravascular LBDCG ALK positivo Linfoma plasmablastico LBDCG HHV8 positivo Linfoma primario de cavidades
Linfoma B alto grado

Linfoma B alto grado con reordenamiento de MYC y BCL2 y/o BCL6 Linfoma B alto grado, NOS
Linfoma B inclasificable Linfoma B inclasificable con características intermedias entre LBDCG y linfoma hodgkin clásico

Los casos biológicamente heterogéneos para los que no disponemos de un criterio aceptado para su subdivisión, se clasifican como LBDCG tipo NOS. Éste se subdivide en subtipo centrogerminal (CG) y de célula B activada (ABC).

La etiología del LBDCG tipo NOS es desconocida. Normalmente suele diagnosticarse de novo pero puede representar la transformación desde un linfoma menos agresivo como leucemia linfática crónica/linfoma linfocítico, linfoma folicular, linfoma de la zona marginal o linfoma de Hogkin predominio linfocítico nodular. La inmunodeficiencia subyacente es un factor de riesgo significativo. El LBDCG tipo NOS, que ocurre en el seno de inmunodeficiencia, se asocia más frecuentemente a VEB positivo.

Este linfoma se manifiesta con afectación nodal o extranodal. En el 40% de los casos la enfermedad está confinada en una localización extranodal. El tracto gastrointestinal (estómago y región ileocecal) es la localización más frecuente. Otras localizaciones comunes son hueso, testículos, bazo, anillo de Waldeyer, glándulas salivares, tiroides, hígado, riñones y glándulas adrenales. El LBDCG con afectación renal o adrenal se asocia con más riesgo de infiltración en SNC. Los linfomas cutáneos se componen predominantemente de linfocitos B grandes y se consideran distintas entidades.

La afectación de la médula ósea puede ser discordante (en un 10-25% de los casos podría tener infiltración por linfoma B de bajo grado) o concordante (infiltración por LBDCG). La tasa de detección de la mínima infiltración aumenta con el uso de otras técnicas como citometría de flujo, inmunohistoquímica y citogenética molecular. Asimismo, la tomografía por emisión de positrones (PET) es una técnica sensible para la detección de la infiltración medular concordante pero no para la discordante. Los consensos recientes sugieren que la biopsia médula ósea no es necesaria si la PET es negativa. La expresión periférica del LBDCG es rara.

Desde el punto de vista clínico, los pacientes presentan un rápido crecimiento de la masa tumoral con afectación nodal o extranodal única o múltiple. La mitad de los pacientes presentan estadio I-II aunque la incorporación de la PET en el estadiaje inicial ha aumentado el porcentaje de pacientes con estadios avanzados.

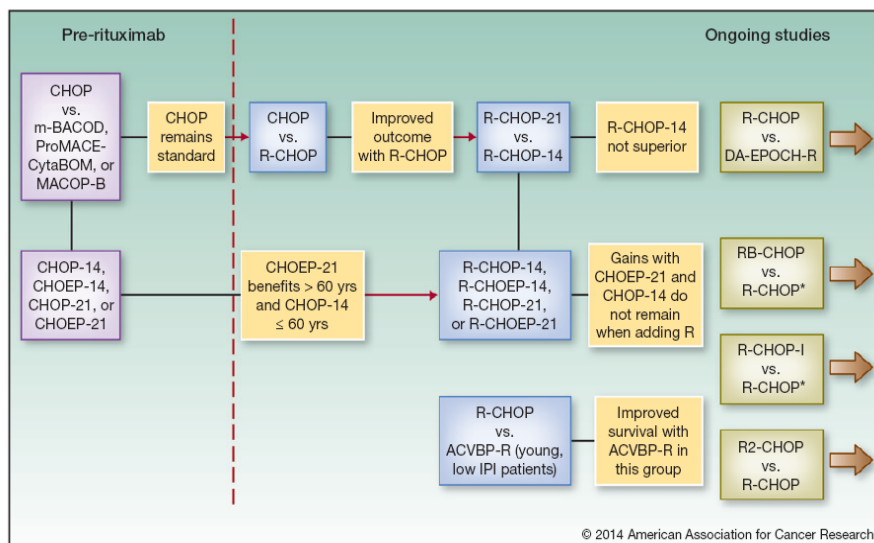
Tratamiento estándar

A pesar de que se trata de un linfoma potencialmente curable, el 20-40% recaen por lo que es importante buscar marcadores pronósticos para tratar de forma diferencial aquellos casos menos susceptibles de ser curados con tratamiento convencional.

El tratamiento estándar de primera línea del LBDCG es Rituximab, Ciclofosfamida, Doxorubicina, Vincristina y Prednisona (R-CHOP) cada 21 días por 6 ciclos(2). La adición del anticuerpo monoclonal (Rituximab) al esquema CHOP demostró un beneficio considerable en términos de supervivencia(3).

Los esfuerzos para mejorar el esquema R-CHOP21 acortando el intervalo a 14 días (R-CHOP14) no han sido satisfactorios(4). Recientemente, se está investigando la incorporación de nuevos fármacos al tratamiento estándar con R-CHOP21. Se han publicado numerosos ensayos clínicos que incluyen la adición de Epratuzumab(5), Bortezomib(6) o Lenalidomida(7). Estos agentes están diseñados para actuar en vías oncogénicas específicas y su acción biológica es distinta a la del R-CHOP. En cualquier caso, se requieren ensayos clínicos randomizados para confirmar la superioridad de la adición de estas drogas a R-CHOP (Figura 1)(8). Por esta razón, son necesarios nuevos factores pronósticos y predictivos basados en la biología del LBDCG para que, de esta manera, estos ensayos clínicos cuenten con marcadores específicos para la selección de los mejores candidatos a las distintas combinaciones con R-CHOP.

Figura 1: Evolución de las estrategias terapéuticas en LBDCG



Factores pronósticos en LBDCG

1) Clásicos:

International Prognostic Index (IPI):

El IPI se creó en 1993 en la era pre-Rituximab(9). Es el score pronóstico más comúnmente empleado en LBDCG. Este modelo incluye 5 factores para predecir la supervivencia:

- Edad >60 años
- Aumento de lactato deshidrogenasa (LDH)
- Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) performance status (PS) ≥ 2
- Estadio Ann Arbor (AA) III-IV
- Localización extranodal ≥ 2

En base al número de factores, se establecen 4 grupos con una supervivencia libre de progresión (SLP) que varía entre un 26% y un 73%. Posteriormente, con la incorporación del Rituximab, el IPI fue revisado por Sehn et al (R-IPI)(10) y se redistribuyeron los grupos en 3 (muy favorable con 0 factores, favorable con 1-2 o desfavorable con 3-5). La supervivencia global (SG) a los 4 años fue del 94%, 79% y 55%, respectivamente. Posteriormente, Ziepert et al confirmaron la validación del IPI en 3 ensayos clínicos fase II/III: MinT (MabThera International Trial), RICOVER-60 y MegaCHOEP(11).

El mayor inconveniente del R-IPI es que no discrimina un subgrupo de pacientes con pronóstico muy malo, dado que, incluso el subgrupo desfavorable, tiene una SLP a los 4 años de un 53%. Esta limitación ha llevado a la generación de nuevas herramientas pronósticas.

MD Anderson Tumor Score (TS):

El TS se generó en 1992 en la era pre-Rituximab y reportó un índice considerando exclusivamente variables relacionadas con el tumor(12). Así, además de la LDH y el estadio incluido en el IPI, añadió otras 3 variables asociadas al tumor:

- Aumento de LDH
- Estadio AA III-IV

- Aumento Beta-2-microglobulina (B2M)
- Masa bulky
- Síntomas B

El estudio incluyó 144 pacientes diagnosticados de linfomas de grado intermedio o inmunoblásticos tratados con CHOP-Bleomicina como primera línea seguido de radioterapia si la afectación era localizada y CHOP-Bleomicina alternando con CMED si era extendida. Se identificaron 2 subgrupos pronósticos: Bajo riesgo (0-2, supervivencia libre de fallo (SLF) a los 3 años del 83%) versus alto riesgo (≥ 3 , SLF a los 4 años del 24%).

La B2M se trata de una cadena ligera del polipéptido que forma parte de los antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad clase I. Su papel como factor pronóstico desfavorable en enfermedades linfoproliferativas (linfoma y mieloma) es controvertido. Varios estudios han demostrado su valor pronóstico en LBDCG tanto en la era pre-Rituximab(12) como post-Rituximab(13). Los niveles altos de B2M se han asociado con enfermedades linfoides malignas que presentan alta carga tumoral, altas tasas de recambio celular y mayor potencial invasivo. Dado que la B2M se excreta por el riñón, el fallo renal puede generar un aumento de los niveles séricos, que se puede observar también en situaciones de inflamación tanto sistémica como focal asociada, como por ejemplo, a eventos cardiovasculares o la edad(14). En consecuencia, niveles altos de B2M pueden conllevar un peor pronóstico secundario tanto al tumor como a características del paciente. La adición de la B2M a las principales variables del IPI ha demostrado ser de utilidad como veremos más adelante.

2) Dosis intensidad relativa:

Como ya hemos comentado, en los últimos años han habido intentos de mejorar la supervivencia aumentando la dosis densidad (CHOP14) o intensidad (CHOEP, ACVBP, consolidación de la primera línea con trasplante autólogo)(15)(16) sin demostrarse beneficios en términos de supervivencia, salvo en grupos muy concretos de pacientes. En relación al R-CHOP14, mediante un ensayo clínico fase III, se confirmó que no había beneficio en comparación con R-CHOP21 por su mayor toxicidad(4)(17).

Los factores relacionados con el tratamiento, como la dosis intensidad relativa (DIR), no siempre se han contemplado de manera rutinaria. La DIR se determina mediante la

proporción entre la dosis de fármaco real administrada y la planeada durante el periodo de duración del tratamiento. Este factor pronóstico es ampliamente conocido en linfoma de Hodgkin(18)(19) pero hay menos evidencias en LBDCG(20).

3) Mejoras de los índices pronósticos:

Con el objetivo de mejorar el R-IPI en los últimos años se han propuesto índices revisados incluyendo nuevas variables que pueden mejorar su capacidad discriminativa en la era Rituximab:

- NCCN-IPI:

Mediante el uso de los datos clínicos de la base de datos de la National Comprehensive Cancer Network (NCCN) en la era Rituximab, se generó un IPI mejorado con el objetivo de optimizar la estratificación del riesgo(21). Para ello, se recogieron datos clínicos de 1650 pacientes diagnosticados de LBDCG de novo entre 2000-2010. Se identificaron 5 factores predictores con un máximo de 8 puntos:

Factores	Puntuación
Edad:	
>40 a ≤60	1
>60 a ≤75	2
>75	3
Estadio AA:	
III-IV	1
LDH:	
>1 a ≤3	1
>3	2
Enfermedad extranodal	1
ECOG ≥2	1

Se generaron 4 grupos: Bajo riesgo (0-1), bajo-intermedio (2-3), alto-intermedio (4-5) y alto riesgo (6-8). En comparación con el IPI, el NCCN-IPI presentaba una mejor discriminación de los grupos de bajo y alto riesgo (SG a los 5 años de 96% y 33% versus 90% y 54% del IPI). Esta serie se validó con una cohorte independiente (n=1138). Se concluyó que el NCCN-IPI era un índice fácil de emplear y que presentaba más potencia que el IPI para predecir la supervivencia en la era del

Rituximab. A pesar de ello, este índice no fue capaz de discernir un subgrupo de muy mal pronóstico por lo que en los últimos años se han ido generando otros nuevos índices pronósticos.

- GELTAMO-IPI:

Con el objetivo de mejorar la identificación del subgrupo de mal pronóstico, Montalbán et al generaron un nuevo índice incorporando la B2M y estratificando la edad y el ECOG(22):

Factores	Puntuación
Edad:	
<65	1
≥65 a ≤79	2
≥80	3
Estadio AA:	
III-IV	1
LDH:	
>1	1
ECOG	
2	1
3-4	2
B2M >1	1

Este índice separa 4 grupos pronósticos con un máximo de 7 puntos (0, 1-3, 4 o ≥5) con una SG del 93%, 79%, 66% y 39%, respectivamente. En comparación con el NCCN-IPI, presenta una mejor discriminación del subgrupo de alto riesgo (SG a los 5 años de 39% versus 49%).

4) Papel pronóstico de variables del hemograma:

El valor pronóstico de los parámetros del hemograma es conocido en algunos tumores sólidos(23). En el contexto del linfoma, hay una evidencia creciente de que el microambiente del tumor y la inmunidad del huésped juegan un importante papel en la progresión(24). Entre las evidencias más importantes reportadas con valor pronóstico en LBDCGB tenemos:

- Recuento absoluto de linfocitos (RAL):

Estudios retrospectivos han confirmado el papel del RAL al diagnóstico para predecir la supervivencia en LBDCG(25)(26) y han reportado que un alto RAL en el momento del diagnóstico se asocia con mejor SLP y SG independientemente del IPI. De hecho, se han realizado intentos de generar nuevos índices incorporando el RAL con el IPI. Cox et al describieron un índice (RAL/R-IPI) que clasificaba a los pacientes en bajo riesgo (R-IPI muy favorable y favorable y $RAL \geq 0,84 \times 10^9/L$), riesgo intermedio (R-IPI desfavorable o $RAL \geq 0,84 \times 10^9/L$) y alto riesgo (R-IPI desfavorable y $RAL \geq 0,84 \times 10^9/L$)(27). En el análisis multivariante, este índice era el predictor más potente para SLP y SG.

- Recuento absoluto de monocitos (RAM):

Asimismo, se ha investigado el número de monocitos detectados en sangre periférica sugiriendo que podría afectar a la patogénesis y pronóstico de esta enfermedad(28). En comparación con el RAL, el alto RAM tiene el efecto opuesto desfavorable. El ratio linfocitos/monocitos (RLM) determinado al diagnóstico podría ser un factor pronóstico en pacientes con LBDCG(29)(30). Wilcox et al describieron un índice que incluyó ambas variables que estratificaba a los pacientes en 3 grupos: bajo riesgo (RAM $< 630/ml$ y RAL $> 1000/mL$), riesgo intermedio (RAM $\geq 630/ml$ o RAL $\leq 1000/mL$) y alto riesgo (RAM $\geq 630/ml$ y RAL $\leq 1000/mL$)(31).

- Recuento absoluto de neutrófilos (RAN):

La neutrofilia favorece el desarrollo y progresión del cáncer proporcionando un adecuado ambiente para su crecimiento(32). Por tanto, se han investigado marcadores inflamatorios como el RAN con potencial implicación pronóstica. Adicionalmente, se ha estudiado la ratio linfocitos/neutrófilos (RLN) al diagnóstico como factor pronóstico independiente en varios tipos de neoplasias(33). El RLN podría ser una herramienta para comparar la respuesta inflamatoria producida por el tumor a la inmunidad del huésped. En este contexto, se ha sugerido como factor pronóstico en LBDCG tratado con R-CHOP(34)(35).

- Recuento de plaquetas:

Por otra parte, se ha evaluado la correlación del recuento de plaquetas al diagnóstico con el pronóstico de pacientes con LBDCG tratados con R-CHOP(36). Chen et al establecieron la trombopenia en $< 150000/mm^3$ y confirmaron, en pacientes con plaquetas $< 150000/mm^3$, una SG al año y 3 años de 80,2% y 16,7%, respectivamente.

Esta supervivencia fue significativamente menor que la SG al año y 3 años de los pacientes con $\geq 150000/\text{mm}^3$, 90,2% y 75,6%, respectivamente.

- Recuento de hemoglobina:

La anemia se ha asociado comúnmente con cáncer y particularmente con linfomas, incluso en aquellos pacientes que no han recibido quimioterapia o en ausencia de infiltración de medula ósea(37). La patogénesis de la anemia asociada al cáncer es multifactorial e incluye disfunción medular(38), problemas con la reutilización del hierro(39) o una inadecuada respuesta a la eritropoyetina(40). El R-IPI o NCCN-IPI no incluyó los niveles de hemoglobina como parte del índice, por lo que Troppan et al analizaron el nivel de hemoglobina al diagnóstico y confirmaron su papel como factor pronóstico independiente en LBDCG(41).

- Amplitud de la distribución eritrocitaria (RDW)

El RDW es un marcador fácilmente obtenible que se relaciona con la respuesta inflamatoria sistémica involucrada en numerosas condiciones fisiopatológicas incluyendo enfermedades cardiovasculares o inflamación progresiva(42)(43). Asimismo, tradicionalmente se ha utilizado en el diagnóstico diferencial de la anemia(44). Recientemente, se ha visto que el RDW podría jugar un papel en la carcinogénesis y en la progresión tumoral(45). A pesar de que los mecanismos que subyacen en la relación entre el RDW y la supervivencia o actividad de la enfermedad está controvertida, se ha asociado con una variedad de marcadores inflamatorios como la proteína C reactiva, tasa de sedimentación eritrocitaria, interleukina-6, receptor soluble de la transferrina y receptor soluble de la necrosis tumoral I y II(46). Varios estudios han confirmado que niveles elevados de RDW al diagnóstico predicen un pronóstico desfavorable en pacientes con LBDCG(47).

5) Papel de la vitamina D

La vitamina D está teniendo cada vez más relevancia por su efecto en la diferenciación celular, proliferación, angiogénesis y apoptosis(48)(49). Niveles bajos de vitamina D circulante se han asociado con mayor riesgo de LNH(50). Asimismo, publicaciones recientes sugieren que niveles bajos de vitamina D predicen un peor pronóstico en LNH(51). En una cohorte de 983 pacientes recientemente diagnosticados de LNH, el 44% presentaban deficiencia de vitamina D [niveles de 25-hidroxivitamina D < 25 ng/mL] con los niveles medidos en los primeros 120 días desde el diagnóstico(51).

Tras ajustarlo por el IPI y el tratamiento recibido, los pacientes con insuficiencia de vitamina D presentaron una peor SLE (hazard ratio (HR) 1,41) y SG (HR 1,99). Se observaron resultados similares en otro estudio que incluyó 359 pacientes diagnosticados de LBDCG en el que la deficiencia de vitamina D predijo una peor supervivencia en aquellos tratados con R-CHOP. In vitro, los resultados sugirieron una menor toxicidad celular mediada por Rituximab con niveles bajos de vitamina D(52). Estos resultados observacionales sugieren que la reposición de vitamina D podría contrarrestar el peor pronóstico en los pacientes con esta insuficiencia.

6) Papel de las pruebas de imagen:

La enfermedad voluminosa por tomografía computarizada (TC), con un diámetro del tumor máximo de 10 cm, ha demostrado predecir un peor pronóstico tanto en pacientes tratados con CHOP como con R-CHOP. Esta característica se objetivó de forma más significativa en el ensayo MINT, que preferentemente incluyó pacientes jóvenes con enfermedad más favorable(53). La PET combinada con TC es claramente superior a la TC exclusivamente. Por todo ello, la evaluación de la masa voluminosa y la actividad metabólica podrían tener un efecto pronóstico adicional en el estadiaje. Asimismo, se está estudiando el volumen metabólico tumoral (VMT) y el valor estandarizado de captación máximo (SUVmáx) medidos por PET como marcadores de masa tumoral y agresividad. De hecho, varios estudios han demostrado que el VMT podría tener más significación pronóstica que el estadio AA e incluso ser un factor pronóstico independiente por encima del IPI(54)(55). Por otra parte, el SUVmáx, se ha correlacionado en pequeñas series con peor ECOG PS y niveles más altos de Ki-67 y con quimio-refractariedad de forma independiente al IPI(56). En un análisis posterior del ensayo GOYA publicado recientemente (n=1346)(57), niveles altos de VMT pero no el SUVmáx se correlacionaron con un peor pronóstico de forma independiente a la célula origen y al IPI(58).

7) Factores moleculares y traslacionales conocidos:

1) Genética:

- Perfiles expresión génica:

El LBDCG presenta una heterogeneidad en cuanto a su patogénesis molecular(59). El análisis de los perfiles de expresión génica reveló la existencia de al menos 3 subtipos moleculares distintos que difieren en la expresión de miles de genes(60):

- CG
- ABC
- Linfoma primario mediastínico

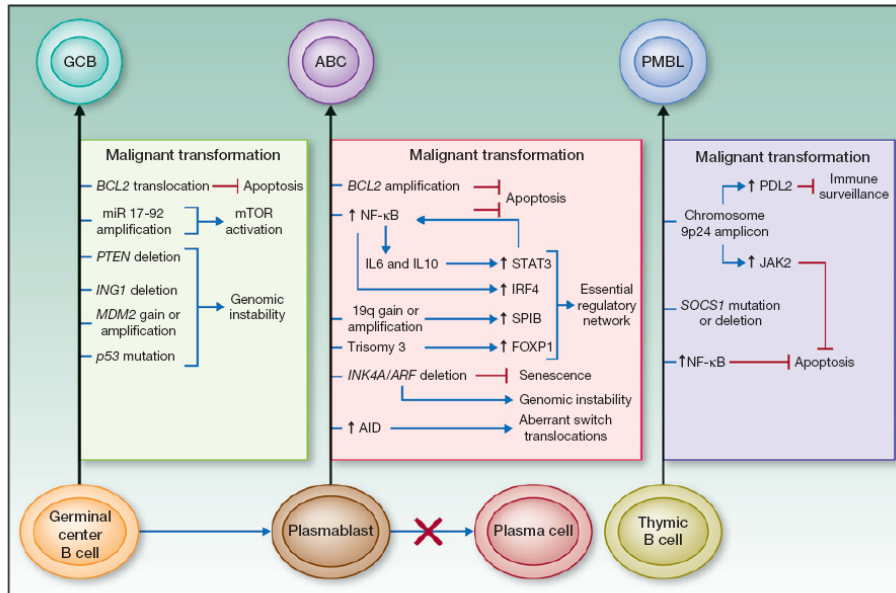
Estos subtipos no sólo difieren en la expresión génica sino también en que dependen de diferentes vías oncogénicas. Asimismo, presentan diferentes tasas de supervivencia con el tratamiento estándar de primera línea(24). Mientras que el subtipo CG responde favorablemente al esquema R-CHOP, más del 50% de los pacientes con subtipo ABC recaerán. Esto conlleva a la necesidad de nuevas estrategias terapéuticas para mejorar el pronóstico de este grupo de pacientes y esto únicamente se puede conseguir con un mejor conocimiento de los mecanismos moleculares subyacentes que conducen a la linfomagénesis.

El subtipo CG se origina de la célula B centrogerminal(60). En consecuencia, estos linfomas expresan genes como el BCL6 o LMO2 que se expresan por células B centrogerminales normales. Varias vías oncogénicas están desreguladas en el subtipo CG y contribuyen a la patogénesis molecular de esta entidad. En aproximadamente 45% de los casos se detecta la translocación t(14;18) yuxtaponiendo el gen BCL2 y el locus IgH. Esto conlleva un aumento de la actividad de la proteína antiapoptótica BCL2. Otra característica del subtipo CG es la desregulación de PTEN mediante la vía de señalización PI3K(24). Otro mecanismo de desregulación de PTEN, que ocurre en 15% de los casos, es la amplificación del locus miR-17-92 que conlleva a su supresión(61). Asimismo, el subtipo CG se caracteriza por la ganancia o amplificación de MDM2, un regulador negativo del gen supresor de tumor p53, así como las deleciones de otros genes supresores de tumores como el TP73 e ING1.

El subtipo ABC deriva de las células B que están en proceso de diferenciarse a células plasmáticas. Se caracteriza por anomalías genéticas adicionales que juegan un importante papel en su patogénesis. El locus INK_a/ARF supresor de tumor está inactivado en el 30% de los casos. Otra característica es la ganancia o amplificación de 18q que se asocia con la sobreexpresión de la proteína antiapoptótica BCL2. Además, la trisomía 3 se detecta frecuentemente en este subtipo y FOXP1 emerge como un potencial target de esta trisomía. Otra característica genética del subtipo ABC es la activación constitutiva de la vía de señalización del BCR y como consecuencia de

NF-κB que promueve la supervivencia y proliferación celular e inhibe la apoptosis (Figura 2).

Figura 2: Vías oncogénicas del subtipo CG y ABC

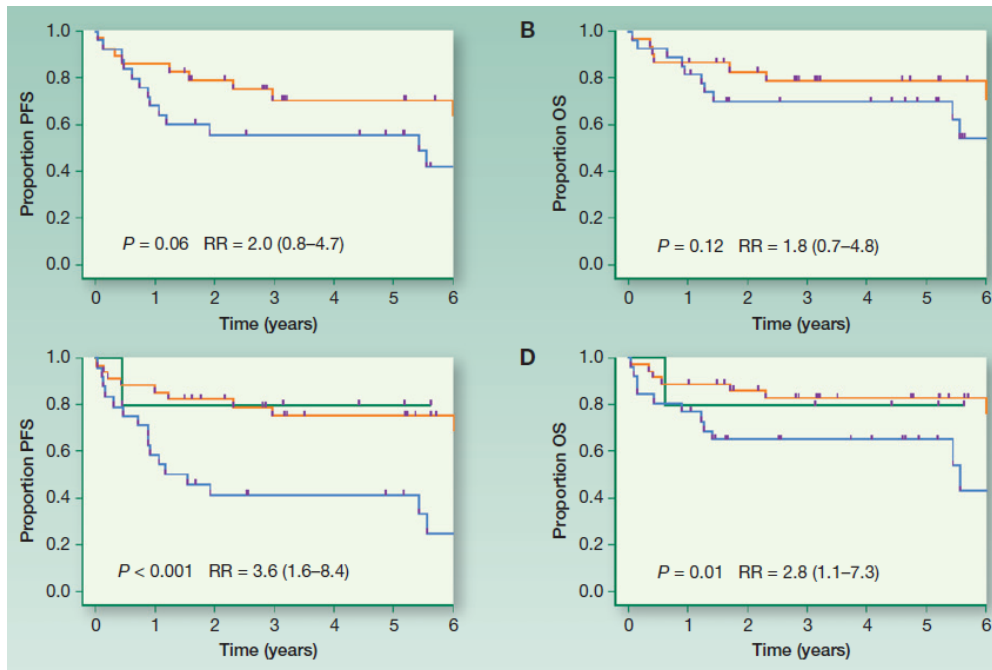


Desafortunadamente, realizar perfiles de expresión génica a todos los pacientes en la práctica clínica es poco factible, por lo que se han generado varios algoritmos de inmunohistoquímica (IHQ) para predecir la célula de origen. Estos algoritmos emplean diferentes anticuerpos contra proteínas relacionadas con las células CG o ABC en los que es preciso especificar el porcentaje estimado de células positivas para cada marcador analizado. Los mayormente empleados son los reportados por Hans et al(62) y Choi et al(63), que se han correlacionado favorablemente con los perfiles de expresión génica y han demostrado diferencias en cuanto a supervivencia entre los diferentes grupos (Figura 3)(8)(64)(65).

Se han generado otros algoritmos como el de Muris(66), Nyman(67) o Natkunam con el uso de un único marcador LMO2(68) (Figura 4). De todos estos algoritmos el de Choi fue el que presentó la mayor concordancia con los perfiles de expresión génica (87%). El algoritmo de Hans también presentó una alta concordancia (86%). El de Nyman y Muris, a pesar de tener una alta concordancia, tenían poca sensibilidad o especificidad (el de Nyman presentó una sensibilidad de sólo un 67% y el de Muris una especificidad del 54%). El uso único del LMO2 presentó la peor concordancia (74%). La mayoría de los estos algoritmos usan anticuerpos para la identificación de expresión de proteínas tanto para el subtipo CG como ABC. Dado que la determinación del subtipo dependía del orden de examinación, se generó un nuevo método llamado Tally, con marcadores de CG (GCET1 y CD10) versus marcadores de

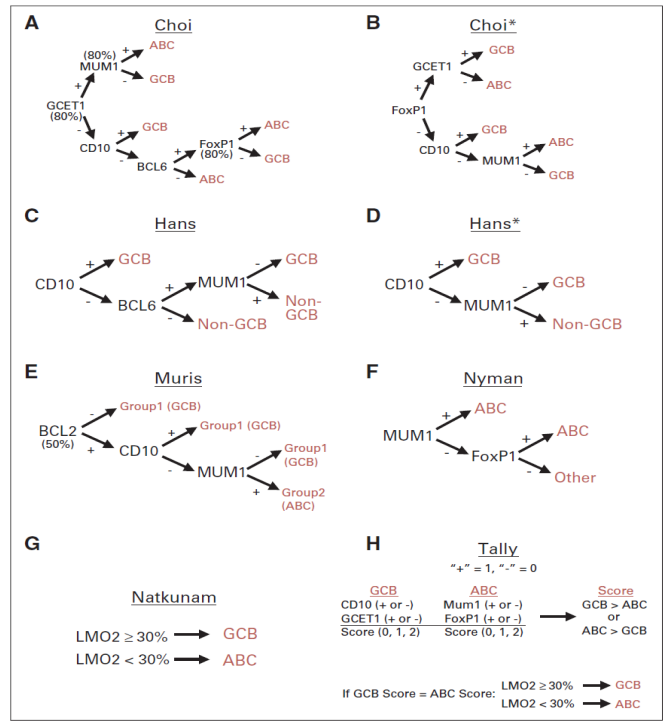
ABC (MUM1 y FOXP1). El mayor número de marcadores positivos era el que determinaba el subtipo. Se empleó un quinto anticuerpo (LMO2) para determinar el inmunofenotipo (positividad indicaba CG) si ambos grupos presentaban el mismo número de marcadores positivos. Con el empleo de este algoritmo, todos los marcadores se consideraron relevantes independientemente del orden, lo cual obtuvo la concordancia más alta (93%).

Figura 3: SLP y SG según IHQ y perfiles expresión génica



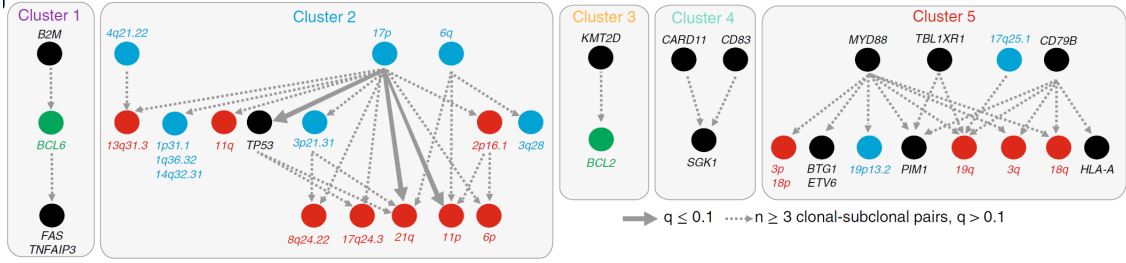
A: SLP con IHQ para CG y ABC. B: SG con IHQ para CG y ABC. C: SLP con perfiles de expresión génica para CG y ABC. D: SG con perfiles de expresión génica para CG y ABC.

Figura 4: Distintos algoritmos por inmunohistoquímica(69)



Sin embargo, en un estudio reciente en el que se llevó a cabo un análisis genético por secuenciación masiva de 304 muestras de LBDCG, se identificaron alteraciones de baja frecuencia, mutaciones, alteraciones somáticas y variantes estructurales que definieron distintas firmas en estos pacientes(70). Se integraron estas alteraciones genéticas usando distintos clusters y se identificaron 5 clusters robustos incluyendo un subtipo ABC de bajo riesgo extrafolicular/zona marginal previamente no conocido, 2 subtipos de CG con diferente pronóstico y alteraciones y un grupo independiente del ABC/CG con inactivación bialélica de TP53, pérdida de CDKN2A e inestabilidad genómica (Figura 5).

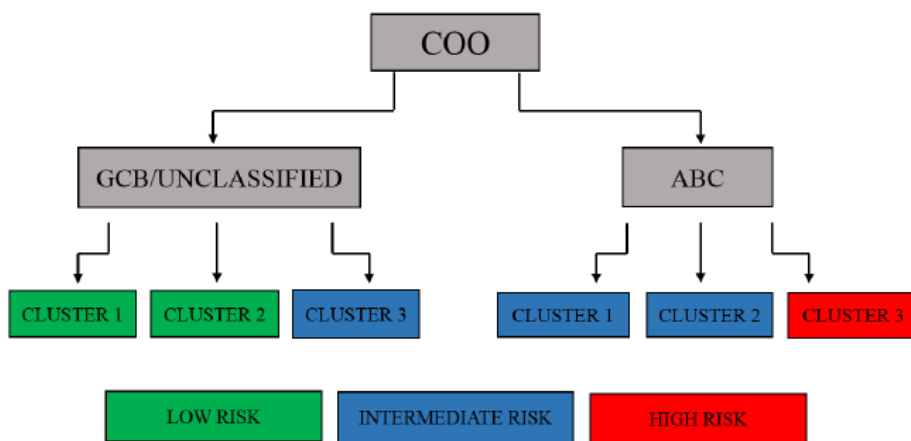
Figura 5: Alteraciones asociadas a los diferentes clusters



Esta nueva caracterización, podría predecir el pronóstico de forma más precisa y con ello definirse distintas estrategias terapéuticas con nuevas combinaciones de forma más dirigida.

Recientemente también, se ha generado un panel de 45 genes centrado en componentes del microambiente (células mesenquimales, dendríticas y células T) y que es aplicable para muestras de tejido en parafina con la plataforma NanoString(71). Con esto, se estratifican los pacientes incluidos en 3 subgrupos que difieren significativamente en términos de SLP y SG (Figura 6). Estos resultados se reprodujeron en una plataforma de NanoString diferente en la que el panel integraba los resultados de *Lymph2Cx*, un panel de 20 genes que reprodujo los resultados de los perfiles de expresión génica usando ARN mensajero (ARNm) extraído de tejidos en parafina, y que ofreció un índice que se podía aplicar a cada nuevo paciente(72).

Figura 6: Categorías pronósticas basadas en la célula de origen y el microambiente



○ Otros oncogenes:

En los últimos años, otros marcadores citogenéticos han demostrado un impacto en el pronóstico tales como la translocación que incluye al oncogen MYC, presente en 5-10% de los casos de LBDCG(73)(74). Otros linfomas con translocación de MYC, como el linfoma de Burkitt, tiene una alta tasa de proliferación, curso clínico agresivo y se beneficia de terapias más intensivas, en cambio, no disponemos de estudios aleatorizados que sugieran que los LBDCG MYC+ se beneficien de terapias más intensivas(75).

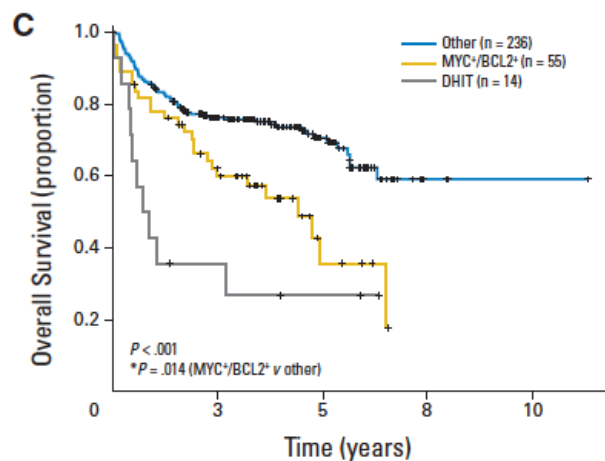
El pronóstico adverso de esta translocación aumenta con el reordenamiento de BCL2 y/o menos frecuentemente BCL6 (76–78) que conlleva a una respuesta pobre al

tratamiento (Figura 7). Concretamente, el 53% de los pacientes con la translocación MYC tienen de forma concomitante la translocación de BCL2 y/o BCL6. Dentro de los linfomas de alto grado establecidos por la WHO 2016, el 60% presentan la translocación MYC y BCL2, el 20% MYC y BCL6 (llamados doble hit, DH) y el 20% restante presentan translocación de los 3 genes, triple hit(79). Los datos del proyecto Lunenburg indican que la supervivencia de ambos DH o triple hits son similares y que todos presentan una peor SLP y SG en comparación con pacientes sin translocación(80). En cambio, se ha sugerido que los LBDCG con translocación de BCL2/MYC son biológicamente distintos a BCL6/MYC(79)(81). Desde el punto de vista del tratamiento, se confirmó que la SG y SLP a los 5 años con R-CHOP fue únicamente del 27% y 18%, respectivamente(82). Por tanto, es evidente que este tratamiento puede ser insuficiente para estos pacientes. El grupo del MD Anderson observó en 129 pacientes que se obtenían tasas de RC más altas, SLP y SG con el esquema R-DA-EPOCH que con R-CHOP(78). Asimismo, en un meta-análisis de 394 pacientes con 11 estudios(83), la primera línea con R-DAEPOCH disminuyó significativamente el riesgo de progresión aunque no tuvo beneficio desde el punto de vista de supervivencia.

Adicionalmente hay evidencia de que la coexpresión mediante inmunohistoquímica de C-MYC y BCL2 en casos de LBDCG (C-MYC $\geq 40\%$ y BCL2 $\geq 70\%$) identifica un subgrupo de LBDCG de conducta clínica especialmente agresiva (Figura 7)(82)(84) (85). Aproximadamente el 20% de los pacientes con LBDCG presentan la coexpresión. El LBDCG doble expresor (DE) es más común en el subtipo ABC (33-46% ABC versus 17% CG), a pesar de que en dos estudios la significación pronóstica del DE fue más marcada en el subtipo CG(86)(87). Una serie retrospectiva ha postulado recientemente que las diferencias pronósticas entre los subtipos ABC y CG se explican por el mayor número de DE en el subtipo ABC(85).

El estudio IHQ del LBDCG DE es simple y robusto como marcador pronóstico y se podría considerar como parte de la práctica clínica. Sin embargo, es un reto desde el punto de vista histológico dado que no hay un consenso en su medición entre los diferentes estudios, hay discordancias inter-observador y hay diferencias en cuanto a los procedimientos de distintos laboratorios. En cualquier caso, no existen estudios prospectivos aleatorizados que confirmen que este subgrupo de pacientes se pueda beneficiar de otros tratamientos distintos al R-CHOP(88).

Figura 7: SG según doble-hit o doble expresor(82)



2) Epigenética:

○ MicroRNAs (miRNAs):

a) *miRNAs en la patogénesis del LBDCG*

Los miRNAs son ARN no codificante de 19-24 nucleótidos que regulan la expresión de genes inactivando su ARNm(89). Estudios previos han demostrado que ciertos miRNAs desempeñan un papel importante en la regulación de la expresión génica y que se encuentran desregulados en distintos cánceres humanos. Los genes que codifican para miRNAs están frecuentemente situados en regiones genómicas típicamente asociadas con cáncer(90). En 2002, Calin et al identificaron por primera vez, una asociación directa entre la de-regulación de la expresión del miR-15 y miR-16 y el desarrollo de leucemia linfática crónica(91). Tras estos hallazgos, se han identificado otro muchos miRNAs que participan en el desarrollo del cáncer en varios tipos de tumores(92). Adicionalmente, varios grupos de investigación han explorado la aplicación clínica potencial de los miRNAs como herramienta diagnóstica y terapéutica para pacientes con cáncer(93–95).

Los miRNA están jugando en la actualidad una papel importante en la expresión proteica y, por tanto, en la diferenciación de la célula B y la oncogénesis en varios tipos de linfoma(96–98). Concretamente, se han identificado miRNAs involucrados en

la hematopoyesis y linfomagénesis del LBDCG(89)(99). El entendimiento de su función biológica exacta continúa siendo un reto en este campo, dado que un miRNA puede influir en múltiples miRNAs y viceversa, múltiples miRNAs pueden influir en la misma molécula de este miRNA, siendo muy compleja la predicción de los múltiples efectos de un miRNA en concreto(100).

A pesar de ello, los efectos de determinados miRNAs en la patogénesis del LBDCG están bien caracterizados. Kim et al demostraron que el miR-125a y el miR-125b activaban la vía del NF-kB, una de las vías más de-reguladas en la patogénesis del LBDCG. Concretamente, observaron que estos miRNAs estaban sobreexpresados en LBDCG y que eran targets del TNFAIP3, un regulador negativo de la vía NF-kB, con la consecuente potenciación de la señalización de esta vía(101).

El cluster miR-17-92, que codifica 6 diferentes miRNAs, está localizado en el cromosoma 13q31-q32, una región frecuentemente amplificada en el subtipo CG. Este cluster de miRNAs contribuye a la supervivencia de células B progenitoras, y por tanto, aumenta la linfomagénesis reprimiendo los genes antiapoptóticos(102) (Tabla 1).

El miR-155, uno de los miRNAs más estudiados, se acumula entre 10 a 30 veces más en distintos linfomas B en comparación con las células B normales. Además, los niveles de expresión del miR-155 son más altos en el subtipo ABC que en el CG(103).

El miR-34, un miRNA pro-apoptótico y supresor de crecimiento, ejecuta esta función mediante la vía del TP53(104). Otro efecto supresor de tumor de este miRNA es la de-regulación de su target FOXP1, bloqueando la proliferación de LBDCG(105).

Tabla 1: miRNAs asociados a la linfomagénesis(89)

Table I. *microRNAs associated with lymphomagenesis.*

microRNA	Target	Method	Notes	References
Pathogenesis				
miR-125a,b	TNFAIP3 (A20)	qPCR	Overexpression in DLBCL	31
miR-17-92				32,33
miR-155	TP53INP1, HGAL, PIK3R1, SMAD5		Overexpression in DLBCL, in ABC higher than a in GCB, initiation of ALL and/or high grade lymphom	34-41
miR-34	FOXP1		Tumour-suppressive	42,43
Diagnosis				
miR-125b	-	Microarray	Up regulated in DLBCL	25
miR-155	-	Microarray, qPCR	Up regulated in DLBCL, lost in Burkitt lymphoma, in ABC higher than in GCB, expression in serum up regulated	25, 27, 28, 48-50, 53
miR-221	-	Microarray, qPCR	Overexpression in ABC	49
miR-21	-	qPCR	Overexpression in ABC, expression in serum up regulated, up regulated in CSF	49, 53, 55
miR17-92	-	Microarray, qPCR	Overexpression in ABC	48
miR-210	-	qPCR	Expression in serum up regulated	53
miR15a	-	qPCR	Expression in serum up regulated	54
miR16-1	-	qPCR	Expression in serum up regulated	54
miR-29c	-	qPCR	Expression in serum up regulated	54
miR-34a	-	qPCR	Expression in serum down regulated	54
miR-19	-	qPCR	Up regulated in CSF	55
miR-92a	-	qPCR	Up regulated in CSF	55
Prognosis				
miR-21	-	Microarray, qPCR	High levels correlate with better OS	49
miR-155	-	-	No prognostic impact	49,56
miR-18a	-	qPCR	High levels correlate with better OS	57
miR-181a	-	qPCR	High levels correlate with better OS	57
miR-222	-	qPCR	High levels correlate with better OS	57
Therapy				
miR-155	SHIP1	qPCR	Withdrawing leads to tumour repression	59
miR-15a	Cyclin D1	qPCR	Reinduce apoptosis	60
miR-16	Cyclin D1	qPCR	Reinduce apoptosis	60

TNFAIP3: Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3; qPCR: quantitative real-time polymerase chain reaction; DLBCL: Diffuse large B-cell lymphoma; TP53INP1: Tumor protein p53-inducible nuclear protein 1; HGAL: human germinal-center associated lymphoma; PIK3R1: phosphatidylinositol 3-kinase; SMAD5: Mothers against decapentaplegic homolog 5; ABC: activated B-cell like; GCB: germinal center B-cell; ALL: acute lymphocytic leukemia; FOXP1: Forkhead box protein P1; CSF: cerebrospinal fluid; OS: overall survival; SHIP1: src homology 2 containing inositol 5-phosphatase.

b) *MiRNAs en el diagnóstico de LBDCG*

Hoy en día, el diagnóstico de LBDCG es histológico suplementado por la IHQ y si están disponibles, los perfiles de expresión génica(106). La adición de los miRNAs en el diagnóstico de los linfomas, podría representar una importante herramienta en el futuro. Un punto de gran relevancia es la diferenciación entre tejido linfático normal y la presencia de neoplasia linfoide. Lawrie et al identificaron 40 miRNAs diferencialmente regulados en muestras de linfomas B en comparación con muestras de linfocitos B normales(107). Usando los 20 miRNAs más de-regulados, pudieron predecir la naturaleza maligna de las muestras con una tasa de éxito del 99%. Estos miRNAs incluían el miR-125b y miR-155, que estaban sobre-expresados en LBDCG(107).

Asimismo, se han hecho esfuerzos para diferenciar los distintos tipos de linfoma. Di Liso et al propusieron un modelo de 128 miRNAs que discriminaba varias neoplasias linfoides, incluyendo el linfoma Burkitt, leucemia linfática crónica, LBDCG, linfoma folicular, linfoma de la zona marginal y linfoma del manto. Para la diferenciación entre linfoma Burkitt y LBDCG, una firma de 19 miRNAs incluyendo el miR-155, fue suficiente para discriminar estas entidades con una exactitud del 93%(97).

Como ya hemos comentado con anterioridad, mediante la IHQ y los perfiles de expresión génica, se pueden determinar los 2 subtipos, CG y ABC(62)(108). Estudios recientes van encaminados a diferenciar estos subtipos mediante los miRNAs(107)(109). En 2007, Lawrie et al realizaron un análisis de microarrays de 225 miRNAs en 4 líneas diferentes de LBDCG(110) y fueron capaces de identificar miR-155, miR-221 y miR-21 teniendo alta expresión en el subtipo ABC en comparación con el CG.

En la mayoría de estudios, se emplearon muestras de tumor congeladas, teniendo en cuenta que en la práctica clínica las muestras en parafina son las mayormente empleadas. Por este motivo, Culpin et al demostraron la igualdad de los resultados con ambas muestras en relación a la medición de la expresión de los miRNAs(111).

c) MiRNAs en el pronóstico de LBDCG

Los estudios sugieren que los miRNAs además de su uso en la mejora del diagnóstico tiene un potencial pronóstico para pacientes con cáncer. El miR-21, establecido como diferenciador entre los subtipos ABC y CG, también juega un papel como marcador pronóstico(110). Niveles elevados de este miRNA se asociaron con SLP prolongadas en pacientes con LBDCG(110). Alencar et al identificaron 3 (miR-18a, miR-181a y miR-222) de 11 miRNAs como factores pronósticos independientes en LBDCG(112). Este grupo integró estos miRNAs en un modelo combinado incluyendo el IPI y un índice con 6 genes predictores de mortalidad y demostró el poder predictivo de estos miRNAs en la SG y en la SLP(112). Montes Moreno et crearon un modelo predictivo para una serie de descubrimiento de 36 pacientes empleando un microarray para identificar los miRNAs diferencialmente expresados basado en la SG(113). Se correlacionaron 57 miRNAs positiva o negativamente con la SG aunque ninguno de ellos pudo discriminar el subtipo ABC o CG. Asimismo, se testó un set de 9 miRNAs en una serie de 240 pacientes. Se asociaron niveles bajos de expresión de estos 9 miRNAs con mejor SLP y SG. Este modelo combinado con el IPI identificó un grupo de alto riesgo con una SLP y SG a los 2 años <50%.

- Metilaciones y acetilaciones:

Otras alteraciones epigenéticas que podrían tener un papel pronóstico en LBDCG serían las metilaciones(114). La metilación del ADN es un marcador epigenético asociado con el silenciamiento de genes(115) que ocurre predominantemente en el nucleótido de la citosina cuando se encuentra adyacente a la guanina (CpG). El CpG muestra un clustering en regiones genómicas específicas. Estos clusters de alta densidad de CpG se conocen como islas CpG y se encuentran frecuentemente en regiones promotoras de genes(115). A pesar de que el mecanismo exacto está todavía por definir, hay evidencia de que esta metilación proporciona un marcador de `memoria´ del silenciamiento de genes mientras que el bloqueo de la transcripción se lleva a cabo por las modificaciones de histonas(116). El silenciamiento epigenético de los genes supresores de tumores por este mecanismo se ha confirmado en numerosos cánceres incluyendo el LBDCG. De hecho, estudios genómicos recientes en pacientes con LNH(117)(118) han relevado que modificadores epigenéticos incluyendo las enzimas modificadoras de histonas y reguladores de la metilación de ADN son los genes más frecuentemente mutados.

Hipótesis y objetivos

HIPÓTESIS

- Distintos marcadores tanto clínicos como biológicos podrían tener un impacto pronóstico en una serie homogéneamente tratada con R-CHOP con o sin radioterapia.
- Desde el punto de vista de los factores clínicos, además de los factores pronósticos estándar en LBDCG, podrían tener un papel pronóstico importante los retrasos en la DIR y nuevas variables de fácil obtención como los parámetros del hemograma y variables de tipo inflamatorio. Combinando todos aquellos factores con significación independiente se podría mejorar la estratificación pronóstica en LBDCG.
- Entre los factores pronósticos biológicos, distintos subtipos de miRNAs asociados con el LBDCG podrían implicar pronóstico diferencial y/o conferir resistencia/sensibilidad al tratamiento estándar.

OBJETIVOS

- Analizar el valor pronóstico de la DIR en 2 cohortes de pacientes con LBDCG tratados con R-CHOP21 o R-CHOP14 y evaluar el impacto diferencial con el incremento de la dosis densidad.
- Evaluar y validar el TS en la era de Rituximab analizando su potencial papel actual en LBDCG.
- Seleccionar variables fácilmente obtenibles a partir de los parámetros del hemograma y valorar la posibilidad de combinar estas variables del hemograma con las variables de los índices pronósticos en LBDCG (IPI, TS o NCCN-IPI). Evaluar los cambios en el poder discriminativo de los índices originales modificados con la adición de estas variables.
- Analizar los distintos miRNAs implicados en la quimiosensibilidad/resistencia al tratamiento y su correlación con los factores pronósticos estándar al diagnóstico.

- Analizar el papel de los miRNAs como predictores de la SLE y SG en LBDCG homogéneamente tratados.

Material y métodos

1. Dosis intensidad relativa:

Selección de pacientes:

Se identificaron todos los pacientes diagnosticados de LBDCG entre 1999-2013 homogéneamente tratados con R-CHOP21 o R-CHOP14 con o sin radioterapia del Hospital Universitario Son Espases (HUSE), Hospital Son LLàtzer (HSLL) y Hospital del Mar (HM). Los pacientes se identificaron desde el registro de Anatomía Patológica para evitar sesgos de selección. Se excluyeron:

- Pacientes que recibieron regímenes más o menos intensos, otras consolidaciones o mantenimientos.
- Enfermedad médica o psiquiátrica grave
- Infiltración del SNC
- Niveles de Bilirrubina >1,5 mg/dL
- Fracción de eyección <50%
- DLCO<50%

Cálculo de RDI y análisis estadístico:

Se determinó la DIR de cada fármaco que conforma el esquema CHOP (Ciclofosfamida, Adriamicina, Vincristina) mediante la proporción entre el fármaco real administrado y la dosis planeada durante el periodo de duración del tratamiento (en semanas). Posteriormente se realizó un promedio consistente en la suma de la DIR de los 3 fármacos dividido entre 3.

La SG y la SLP se determinaron desde la fecha de diagnóstico y se estimaron de acuerdo al método de Kaplan-Meier. Las comparaciones dentro de las distintas variables de interés se realizaron con el test de Long-rank. El análisis multivariante que incluyó las variables significativas del univariante y en caso necesario potenciales confusores se realizó de acuerdo al modelo de regresión de Cox.

2. Validación del TS:

Selección de pacientes:

Desde la base nacional de LBDCG del GELTAMO (n=2156) se seleccionaron de forma retrospectiva aquellos pacientes que hubieran recibido tratamiento de primera con R-

CHOP, que tuvieran todas las variables del IPI y TS disponibles y que tuvieran al menos 1 año de seguimiento (n=1327).

Análisis estadístico:

El principal objetivo fue la SLP, definida como el tiempo desde el diagnóstico hasta la recaída (no obtención de RC al finalizar la primera línea de tratamiento o progresión temprana, recaída o muerte por cualquier causa). Dado que la evaluación de la RC podría diferir entre los hospitales participantes o el periodo de tiempo incluyendo los criterios de Cheson o Lugano, se excluyeron los casos con un seguimiento menor de 12 meses para evitar sesgos de sensibilidad y especificidad relacionados con los diferentes criterios de respuesta en términos de identificación de progresión. La SG se calculó desde la fecha del diagnóstico hasta la muerte por cualquier causa. Tanto la SLP como la SG se analizaron con el método de Kaplan-Meier y se compararon usando el test de long-rank. Para el análisis univariante y multivariante se usó el modelo de regresión de Cox. Las comparaciones entre los diferentes scores se llevaron a cabo mediante el índice C.

Diseño de TS mejorado:

Para el desarrollo del TS mejorado, la serie se dividió de forma no aleatorizada en una cohorte de descubrimiento y validación representando un 85% (toda la serie excluyendo los centros de la serie de validación; n=1124) y 15% (HM, HUSE y Hospital Dr. Negrín; n=203), respectivamente. Para afinar en la identificación de un subgrupo de muy mal pronóstico con las variables incluidas en el TS, se testó la posibilidad de analizar una categorización adicional de las distintas variables incluidas en el TS original (estadio AA, LDH y B2M), las dos últimas con el empleo de MAXSTAT, Cubic splines y minimizando los residuales de Martingale. Los síntomas B o la masa voluminosa se incluyeron como binarias originales.

3. Inclusión de variables del hemograma en un nuevo índice pronóstico:

Pacientes y selección de muestras:

Se identificaron pacientes diagnosticados de LBDCG desde los archivos de 20 hospitales de GELTAMO. Los pacientes fueron diagnosticados desde enero de 1998 a julio 2014. Para este estudio, se seleccionaron pacientes homogéneamente tratados con R-CHOP con o sin radioterapia, con un mínimo de un año de seguimiento y que tuvieran disponibles las variables a estudio (variables del hemograma y B2M) (n=992). Se excluyeron aquellos pacientes que recibieron tratamientos con intención no curativa, linfoma primario testicular y del SNC y aquellos que tuvieran datos no disponibles.

Las principales características clínicas en el momento del diagnóstico que se recogieron fueron edad, sexo, estadio AA, LDH y B2M, síntomas B, masa voluminosa (>10 cm) y ECOG PS. Adicionalmente se recogieron variables del hemograma: RAL, RAM, RAN, RDW, plaquetas y hemoglobina. Todas las variables cuantitativas fueron estandarizadas usando los valores de referencia de cada centro.

Se definió la RC como la desaparición de todas las adenopatías y afectación extranodal mediante técnicas de imagen (TC en todos los casos y PET en algunos) y si disponible mediante una biopsia.

Análisis estadístico:

El principal objetivo fue la SLP, definida como el tiempo desde el diagnóstico hasta la progresión (no obtención de RC al finalizar la primera línea de tratamiento o progresión temprana, recaída o muerte por cualquier causa). Dado que la evaluación de la RC podría diferir entre los hospitales participantes o el periodo de tiempo incluyendo los criterios de Cheson o Lugano, se excluyeron los casos con un seguimiento menor de 12 meses para evitar sesgos de sensibilidad y especificidad relacionados con los diferentes criterios de respuesta en términos de identificación de progresión. La SG se calculó desde la fecha del diagnóstico hasta la muerte por cualquier causa. Tanto la SLP como SG se analizaron con el método de Kaplan-Meier y se compararon usando el test de Log-rank. Para el análisis univariante y multivariante se usó el modelo de regresión de Cox.

Creación de un nuevo índice:

Para generar el nuevo score, la serie global se dividió en una serie de descubrimiento y de validación con una proporción de 79% (n=780) y 21% (n=212), respectivamente.

La selección de las variables para incluirlas en el nuevo índice tuvo en cuenta los valores del hemograma estandarizados usando los valores de referencia de cada centro. Los puntos de corte óptimos se calcularon mediante MAXSTAT, usando Cubic splines y minimizando los residuos de Martingale. Las comparaciones entre los diferentes scores se llevaron a cabo mediante el índice C.

4. Papel pronóstico de los miRNAs

Selección de pacientes:

Se revisaron todos los pacientes diagnosticados de LBDCG entre 1999-2013 homogéneamente tratados con R-CHOP con o sin radioterapia del HUSE, HSLL y HM. Los pacientes se obtuvieron desde el registro de Anatomía Patológica para evitar sesgos de selección. Se excluyeron:

- Aquellos pacientes que no tuvieran material genómico válido para este estudio o datos clínicos relevantes.
- Aquellos pacientes que no hubieran recibido el tratamiento estándar basado en R-CHOP +/- radioterapia.
- Aquellos pacientes que presentasen al diagnóstico enfermedades concomitantes graves tanto médicas como psiquiátricas o alteraciones del sistema nervioso central.

Diseño de estudio:

- Se seleccionaron los casos homogéneamente tratados con R-CHOP con o sin radioterapia.
- Se obtuvieron los datos diagnósticos y clínicos incluyendo el IPI y TS.
- Se obtuvieron las muestras, se realizaron los cortes de tejido en parafina y posteriormente se procedió a la extracción de ARN.
- Se realizaron los microarrays de microRNAs. Para ello, se empleó un kit de miRNAs Affimetrix que incluyó 6631 dianas:
 - 2578 miRNAs maduros
 - 2025 pre-miRNAs
 - 1996 Human snoRNA, CDBox RNA y otros non coding RNAs

- Posteriormente se realizó un análisis bioinformático de los microRNAs con expresión diferencial en una serie de descubrimiento que incluyó 2 grupos diferentes de pacientes desde el punto de vista pronóstico (remisión completa versus refractariedad o recaída precoz).
- Se procedió a la validación de los microRNAs con expresión diferencial a través de PCR cuantitativa en la serie global.
- Finalmente se realizó el análisis clínico-biológico de datos.

Técnicas empleadas en el estudio:

- La extracción de ARN a partir de tejido parafinado se llevó a cabo con Recover All Total Nucleic Acid Isolation, kit AM1975.
- El análisis de miRNAs se realizó con el kit miRNA 4 de Affimetrix.
- La PCR cuantitativa se basó en sondas SyberGreen.

Análisis estadístico:

Se realizó un análisis univariante de la influencia de las diversas variables clínicas y biológicas al diagnóstico sobre la SG y SLE a través de comparación de curvas de supervivencia con el test Log Rank así como el análisis multivariante de la influencia de las diversas variables clínicas y biológicas al diagnóstico sobre la SG y SLE a través de la Regresión de Cox. Para el contraste entre variables categóricas se usó el test exacto de Fisher o de Chi-cuadrado según corresponda. Entre variables categóricas y cuantitativas se emplearon los test no paramétricos U de Mann Whitney o Kruskal-Wallis. Todos los valores de p reportados fueron a dos colas y la significación estadística se definió como $p < 0,05$.

Resultados

Dosis intensidad relativa (Anexo1)

Selección de pacientes y características clínicas:

Se analizaron un total de 188 pacientes diagnosticados y tratados en HUSE. 73 pacientes fueron excluidos por diversos motivos: no habían recibido Rituximab (n=29), habían recibido tratamiento de consolidación adicional como trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos o Rituximab de mantenimiento (n=25), otros regímenes con mayor o menos intensidad (n=9), traslado a otro centro (n=6), diagnosticados de LBDCG por autopsia (n=2) y por otras razones (n=2). Se incluyeron 115 pacientes (74 en la cohorte de R-CHOP21 y 41 en la R-CHOP14). Se siguió el mismo proceso de selección tanto para el HSLL como para el HM con la inclusión de 24 y 18 pacientes, respectivamente, con un total de 74 pacientes en la cohorte de R-CHOP21 y 83 pacientes en la de R-CHOP14. La Tabla 2 refleja que las 2 cohortes fueron similares en la mayoría de características clínicas salvo la edad, que fue más joven en el grupo de R-CHOP14.

Tabla 2: Características generales de los pacientes:

	R-CHOP21 (N=74)	R-CHOP14 (N=83)	p
Edad	65 (25-88)	55 (15-79)	0,001
Sexo (M/F)	34 (46%) / 40 (54%)	51 (61%) / 32 (39%)	0,056
ECOG PS >1	17 (23%)	18 (22%)	0,85
Estadio III-IV	40 (54%)	48 (58%)	0,75
Síntomas B	25 (34%)	26 (31%)	0,86
Elevación LDH	33 (46%)	40 (49%)	0,75
Localización extranodal >1	8 (11%)	19 (23%)	0,057
Masa voluminosa	23 (31%)	34 (41%)	0,24
aIPI >1	31 (42%)	31 (38%)	0,63
R-IPI desfavorable	24 (32%)	26 (32%)	1
NCCN-IPI			
Bajo	9 (13%)	17 (21%)	0,31
Bajo-Intermedio	27 (39%)	35 (44%)	
Intermedio-Alto	26 (38%)	24 (30%)	
Alto	7 (10%)	4 (5%)	
Elevación B2M	32 (49%)	31 (39%)	0,24

Radioterapia	27 (36%)	27 (32%)	0,62
--------------	----------	----------	------

Tratamiento y reducciones de dosis intensidad:

Las medianas del número de ciclos de R-CHOP recibidos fueron de 6 en ambos grupos (rango 1-8). Los pacientes del grupo de R-CHOP14 recibieron profilaxis primaria con G-CSF mientras que el 41% de los pacientes del grupo de R-CHOP21 recibieron profilaxis secundaria. Únicamente se reservó la profilaxis primaria para el 28% de los pacientes que tuvieron más de un 20% de riesgo de neutropenia febril siguiendo las guías sobre el uso de G-CSF(119)(120). El 30% de los pacientes del grupo de R-CHOP no necesitaron soporte con G-CSF. En ambos grupos, un 36% y 32% de los pacientes se consolidaron con radioterapia para R-CHOP21 y R-CHOP14, respectivamente (p=0,62).

A pesar de estas diferencias en la política de uso de G-CSF como profilaxis, la mediana de reducción de la DIR demostró una tendencia a ser mayor en la cohorte de R-CHOP14: 9,2% versus 5,8% para R-CHOP21 (p=0,094). Sin embargo, el porcentaje de pacientes con una reducción en la DIR mayor del 15% fue similar entre ambos grupos (34% and 31% para R-CHOP14 y R-CHOP21, respectivamente (p=0,74). Las causas de una reducción mayor del 15% en el grupo de R-CHOP14 (n=24) fueron: complicaciones infecciosas en 14 pacientes (48%), toxicidad hematológica en 6 (21%), edad y comorbilidades en 2 (7%), neurotoxicidad en 2 (7%), falta de adherencia o problemas logísticos en 2 (7%) y otros en 2 (7%). Las causas de una reducción mayor del 15% en el grupo de R-CHOP21 (n=23) fueron: edad y comorbilidades en 12 (52%), toxicidad hematológica en 4 (17%), complicaciones infecciosas en 2 (9%), mucositis en 2 (9%), falta de adherencia en 1 (4%) y otras en 2 (9%).

Análisis de supervivencia entre ambos grupos:

Las tasas de respuesta global y RC fueron similares en ambos grupos: 86% y 76% para R-CHOP21 y 94% y 74% para R-CHOP14 (p=0,017 y p=0,85, respectivamente). Sin embargo, cuando consideramos únicamente aquellos pacientes con una reducción de DIR mayor del 15% (n=49), se observó una tasa de RC significativamente menor en el grupo de R-CHOP21 en comparación con la cohorte de R-CHOP14 (52% versus 82%, respectivamente; p=0,033).

La mediana de seguimiento de los pacientes vivos fue de 68 meses (4-156). Las Tablas 3 a 5 muestran el análisis univariante y multivariante de los factores

pronósticos que influyen en la SLP y SG. Si consideramos la serie global (Tabla 3), no hubo diferencias entre las 2 cohortes en términos de SLP y SG (Figura 8). Una reducción mayor del 15% en la DIR fue el único factor independientemente asociado a peor SG (RR 2,63) y SLP (RR 2,42). La edad avanzada (RR 3,19) y el ECOG PS >1 (RR 2,25) también influyeron de forma independiente en la SG, y el R-IPI desfavorable se asoció con peor SLP (RR 2,62).

Tabla 3: Factores pronóstico que influyen en la SG y SLP en el grupo global

	SG-5 años	p	SLP-5 años	p
Edad (años):				
0-60	86% (78-94)	0,001	80% (72-89)	0,047
>60	65% (54-77)		67% (55-79)	
Sexo:				
Masculino	78% (69-88)	0,58	75% (65-85)	0,9
Femenino	73% (62-84)		72% (61-84)	
ECOG PS:				
0-1	80% (73-88)	0,001	77% (69-85)	0,1
2-4	60% (44-76)		63% (45-81)	
Estadio Ann Arbor:				
I-II	79% (69-89)	0,33	86% (78-94)	0,006
III-IV	74% (64-84)		64% (53-65)	
Síntomas B:				
No	83% (75-90)	0,008	81% (73-89)	0,008
Sí	62% (48-76)		57% (42-73)	
LDH:				
Normal	84% (75-92)	0,15	80% (70-90)	0,057
Elevada	67% (56-78)		67% (56-79)	
Localización extranodal:				
0-1	78% (65-92)	0,47	75% (67-83)	0,47
>1	65% (46-83)		71% (53-89)	
Masa voluminosa:				
No	77% (68-85)	0,87	76% (67-85)	0,18
Sí	75% (63-86)		70% (58-83)	
B2M:				
Normal	85% (77-93)	0,012	80% (71-89)	0,2
Elevada	70% (58-82)		71% (59-84)	

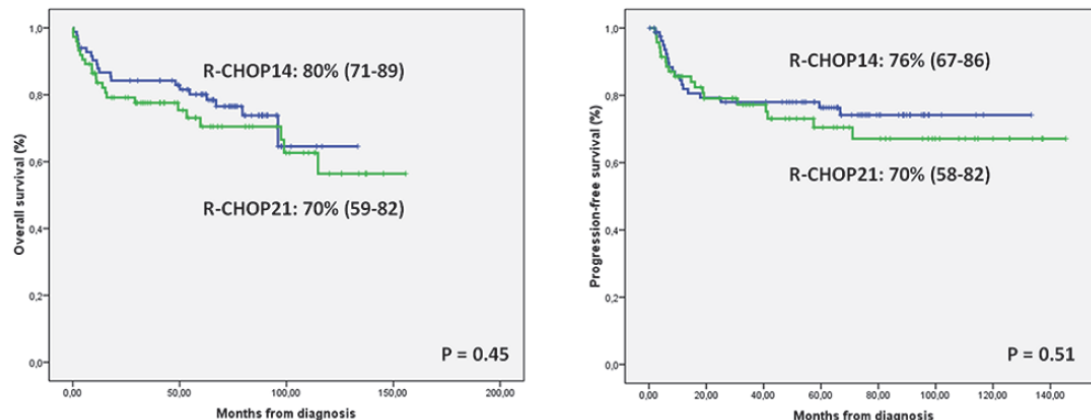
R-IPI:		0,011		
Bajo-Intermedio	83% (76-91)		83% (75-90)	0,001
Alto	60% (46-74)		56% (40-71)	
NCCN-IPI:		<0,001		
Bajo-Intermedio	78% (71-85)		75% (67-82)	0,010
Alto	34% (5-63)		48% (11-85)	
Radioterapia:				
Sí	82% (71-93)	0,21	80% (69-91)	0,25
No	73% (64-82)		70% (61-80)	
Reducción DIR:				
0-15%	83% (75-91)	0,002	82% (74-90)	0,001
>15%	62% (48-75)		57% (42-72)	
Grupo de tratamiento:				
R-CHOP14	80% (71-89)	0,45	76% (67-86)	0,51
R-CHOP21	70% (59-82)		70% (58-82)	
Análisis multivariante				
	SG		SLP	
Parámetros	RR (IC 95%)	p	RR (IC 95%)	p
Edad >60 años	3,19 (1,56-6,53)	0,002	-	-
Reducción DIR >15%	2,63 (1,32-5,26)	0,006	2,42 (1,24-4,69)	0,009
ECOG PS >1	2,25 (1,12-4,5)	0,022	-	-
R-IPI desfavorable	-	-	2,62 (1,35-5,09)	0,005

Tabla 4: Factores pronósticos que influyeron en la SG y SLP

	R-CHOP14				R-CHOP21			
	SG-5 años	p	SLP-5 años	p	SG-5 años	p	SLP-5 años	p
Edad:								
0-60 años	86% (76-96)	0,057	80% (69-91)	0,2	86%	0,006	81%	0,17
>60 años	71% (54-87)		70% (52-87)		(70-100)		(61-100)	
					62% (47-77)		64% (49-79)	
Sexo:								
Hombre	80% (69-91)	0,92	78% (66-90)	0,86	74% (57-92)	0,63	71% (55-87)	0,85
Mujer	80% (66-95)		74% (59-90)		67% (52-83)		70% (54-87)	
ECOG PS:								
0-1	84% (74-93)	0,021	79% (69-89)	0,19	75% (62-89)	0,032	73% (55-90)	0,34

2-4	67% (45-88)		66% (42-90)		53% (29-77)		61% (47-74)	
Estadio:								
I-II	85% (73-97)	0,09	91% (81-100)	0,01	72% (56-87)	0,82	81% (54-100)	0,17
III-IV	76% (64-88)		65% (51-80)		68% (50-87)		60% (46-74)	
Síntomas B:								
No	91% (83-93)	<0,001	85% (75-95)	0,005	72% (59-86)	0,88	76% (57-95)	0,39
Sí	57% (38-76)		55% (34-76)		65% (43-88)		58% (34-81)	
LDH:								
Normal	90% (80-99)	0,24	84% (72-96)	0,057	76% (61-91)	0,41	75% (59-91)	0,48
Elevada	69% (55-84)		70% (54-85)		62% (44-81)		64% (45-82)	
Localización extranodal:								
0-1	85% (77-94)	0,14	78% (67-88)	0,27	70% (58-83)	0,73	70% (52-89)	0,48
>1	63% (41-85)		71% (49-92)		71% (38-100)		64% (45-82)	
Masa voluminosa:								
No	85% (75-95)	0,45	82% (71-94)	0,049	67% (52-82)	0,65	68% (53-83)	0,95
Sí	73% (58-88)		67% (50-84)		78% (61-95)		75% (56-94)	
B2M:								
Normal	83% (72-94)	0,38	78% (66-90)	0,46	89% (78-100)	0,008	83% (70-97)	0,27
Elevada	77% (62-92)		74% (58-91)		61% (41-80)		65% (45-86)	
R-IPI:								
Bajo-Intermedio	87% (78-96)	0,18	85% (75-95)	0,010	78% (65-91)	0,023	81% (69-92)	0,022
Alto	65% (47-84)		60% (40-80)		55% (33-76)		49% (25-73)	
NCCN-IPI:								
Bajo-Intermedio	82% (74-91)	<0,001	78% (68-87)	0,014	72% (59-85)	0,059	70% (57-83)	0,18
Alto	25% (0-67)		50% (0-100)		38% (0-77)		44% (0-88)	
Radioterapia:								
Sí	85% (72-98)	0,16	78% (62-93)	0,79	77% (60-95)	0,73	82% (65-98)	0,18
No	78% (66-89)		75% (63-87)		66% (51-82)		64% (48-79)	
Reducción DIR:								
0-15%	79% (68-90)	0,82	82% (71-93)	0,12	88% (77-98)	<0,001	82% (71-94)	<0,001
>15%	82% (67-96)		65% (47-84)		37% (27-48)		43% (19-67)	

Figura 8: SG y SLP actuarial a 5 años en las cohortes de R-CHOP21 y R-CHOP14



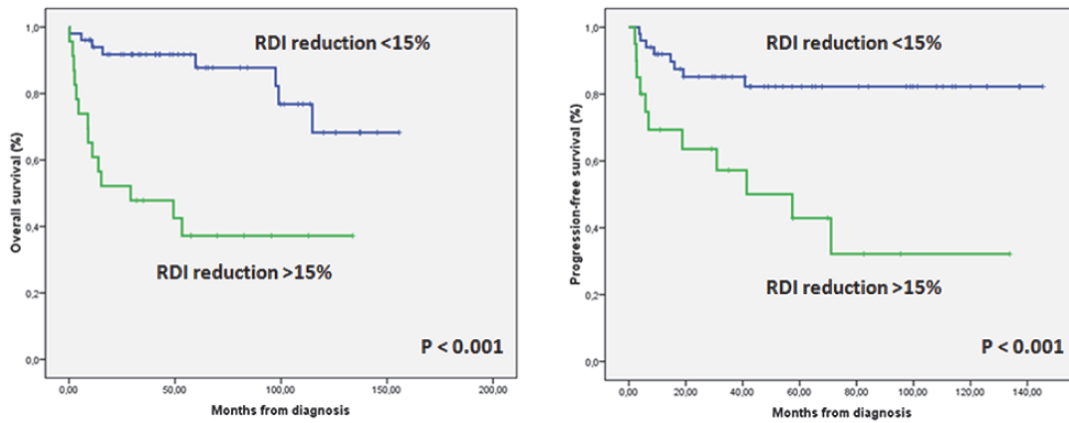
En el grupo de R-CHOP21 (Tabla 4), tanto la reducción de la DIR mayor del 15% (RR 7,41) como el R-IPI desfavorable (RR 2,99), fueron asociados independientemente con peor SG. Para SLP únicamente la reducción de la DIR mayor del 15% (RR 4,41) fue asociado de forma independiente con peor SLP (Figura 9).

Tabla 5: Análisis multivariante

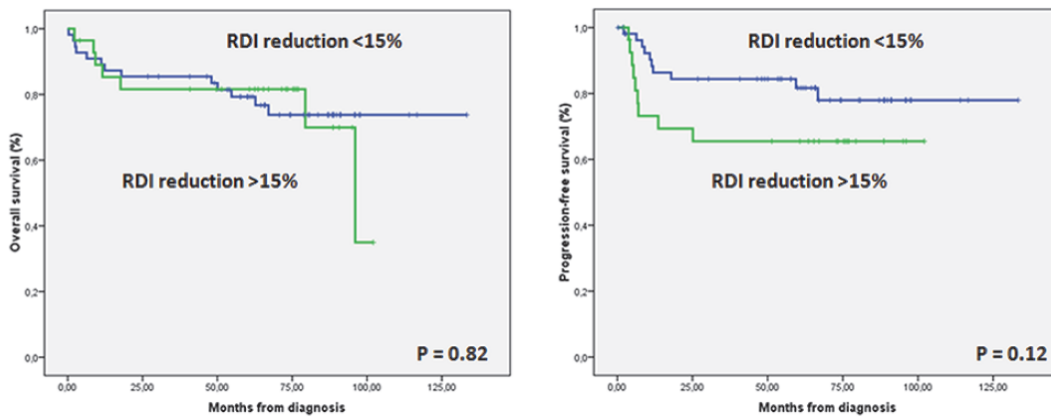
R-CHOP21						
	SG			SLP		
Parámetros	p	RR (exp. B)	Intervalo confianza (IC) 95%	p	RR (exp. B)	IC 95%
Reducción DIR >15%	<0,001	7,41	2,51-21,83	0,001	4,41	1,77-10,99
R-IPI desfavorable	0,032	2,99	1,1-8,16	-	-	-
R-CHOP14						
Parámetros	p	RR (exp. B)	IC 95%	p	RR (exp. B)	IC 95%
NCCN-IPI alto	0,005	7,09	1,83-27,42	-	-	-
Síntomas B	<0,001	5,37	2,11-13,7	-	-	-
Estadio AA	-	-	-	0,004	6,26	1,77-22,13
Enfermedad bulky	-	-	-	0,005	4,05	1,54-10,67

Figura 9: Impacto diferencial de la reducción de la DIR en las cohortes de R-CHOP21 y R-CHOP14

R-CHOP21 cohort



R-CHOP14 cohort



En cambio, en el grupo de R-CHOP14 el NCCN-IPI desfavorable (riesgo relativo (RR) 7,09) y la presencia de síntomas B (RR 5,37) se asociaron de forma independiente a peor SG, y el estadio III-IV (RR 6,26) y la masa voluminosa (RR 4,05) se relacionaron independientemente con peor SLP. Las reducciones de la DIR no mostraron diferencias estadísticamente significativas ni en SG ni en SLP en los pacientes tratados con R-CHOP14. Sin embargo, hubo una tendencia hacia una mejor SLP en aquellos pacientes con una reducción de DIR menor del 15%. Esto sugiere que en el grupo de R-CHOP14 es también un factor importante pero que presenta un margen más amplio de seguridad al contar con una mayor dosis-densidad (Figura 9).

Validación del TS:

Características de los pacientes:

Las principales características de los pacientes incluidos en este estudio (n=1327) se resumen en la Tabla 6. En relación al R-IPi, el 12%, 45% y 43% pertenecen a los grupos de bajo, intermedio y alto riesgo, respectivamente. Considerando el TS original, 53% y 47% se clasificaron como bajo y alto riesgo.

Tabla 6: Características de los pacientes

Características	Serie global (N=1327)	Cohorte descubrimiento (N=1124)	Cohorte validación (N=203)	p
Edad:				
- 18-60 años	580 (44%)	489 (44%)	91 (45%)	0,76
- > 60 años	747 (56%)	635 (56%)	112 (55%)	
Sexo:				
- Masculino	658 (50%)	559 (50%)	99 (49%)	0,76
- Femenino	663 (50%)	559 (50%)	104 (51%)	
LDH:				
- Normal	611 (46%)	521 (46%)	90 (44%)	0,65
- Elevada	716 (54%)	603 (54%)	113 (56%)	
Estadio:				
- I-II	518 (39%)	442 (39%)	76 (37%)	0,64
- III-IV	809 (61%)	682 (61%)	127 (63%)	
Localización extranodal:				
- 0-1	1087 (82%)	933 (83%)	154 (76%)	0,017
- >1	238 (18%)	189 (17%)	49 (24%)	
ECOG PS:				
- 0-1	916 (70%)	785 (70%)	131 (66%)	0,27
- >1	394 (30%)	328 (29%)	66 (33%)	
Síntomas B:				
- Sí	504 (38%)	412 (37%)	92 (45%)	0,023
- No	823 (62%)	712 (63%)	111 (55%)	
Masa voluminosa:				
- Sí	385 (29%)	319 (28%)	66 (32%)	0,24
- No	942 (71%)	805 (72%)	137 (67%)	
B2M:				
- Normal	657 (50%)	565 (50%)	92 (45%)	0,2
- Elevada	670 (50%)	559 (50%)	111 (55%)	

Tasas de respuesta, SLP y SG teniendo en cuenta el TS en la era del Rituximab:

En nuestra serie, 1080 (81%) obtuvieron RC a la primera línea de tratamiento. La mediana de seguimiento fue de 59 meses (12-176). La SLP y la SG a los 5 años fueron del 62% (IC 95%: 59-64) y 74% (IC 95%: 72-77), respectivamente. Al último seguimiento, 338 (26%) habían recaído o progresado y 364 (27%) habían fallecido. En el análisis de SLP y SG univariante y multivariante, todas las variables del TS original obtuvieron un papel pronóstico independiente en nuestra serie, así como todas las variables del IPI excepto >1 afectación extranodal (Tabla 7).

Tabla 7: Análisis univariante y multivariante de las variables para SLP y SG

Análisis univariante	SLP-5 años (IC 95%)	p	SG-5 años (IC 95%)	p
Edad:				
- 0-60 años	67% (63-71)	<0,001	81% (78-85)	<0,001
- >60 años	57% (54-61)		69% (65-72)	
Sexo:				
- Masculino	58% (54-62)	0,006	71% (67-74)	0,01
- Femenino	66% (62-69)		78% (75-81)	
LDH:				
- Normal	72% (68-76)	<0,001	84% (80-87)	<0,001
- Elevada	53% (49-56)		66% (63-70)	
Estadio:				
- I-II	77% (73-81)	<0,001	86% (83-89)	<0,001
- III-IV	52% (48-55)		67% (63-70)	
Afectación extranodal:				
- 0-1	65% (62-68)	<0,001	77% (74-79)	<0,001
- >1	46% (39-53)		63% (56-69)	
ECOG PS:				
- 0-1	69% (66-72)	<0,001	81% (78-84)	<0,001
- >1	45% (40-50)		58% (52-63)	
Síntomas B:				
- Sí	47% (42-52)	<0,001	62% (58-67)	<0,001
- No	70% (67-74)		81% (79-84)	
Masa voluminosa:				
- Sí	53% (48-58)	<0,001	67% (62-72)	<0,001
- No	65% (62-68)		77% (74-80)	
B2M:				
- Elevada	52% (48-56)	<0,001	65% (61-69)	<0,001
- Normal	71% (67-75)		83% (80-87)	
Análisis multivariante	SLP HR (IC 95%)	p	SG HR (IC 95%)	p
Edad > 60 años	1,22 (1,01-1,47)	0,036	1,64 (1,3-2,06)	<0,001
Estadio III-IV	1,75 (1,4-2,19)	<0,001	1,52 (1,16-2)	0,002

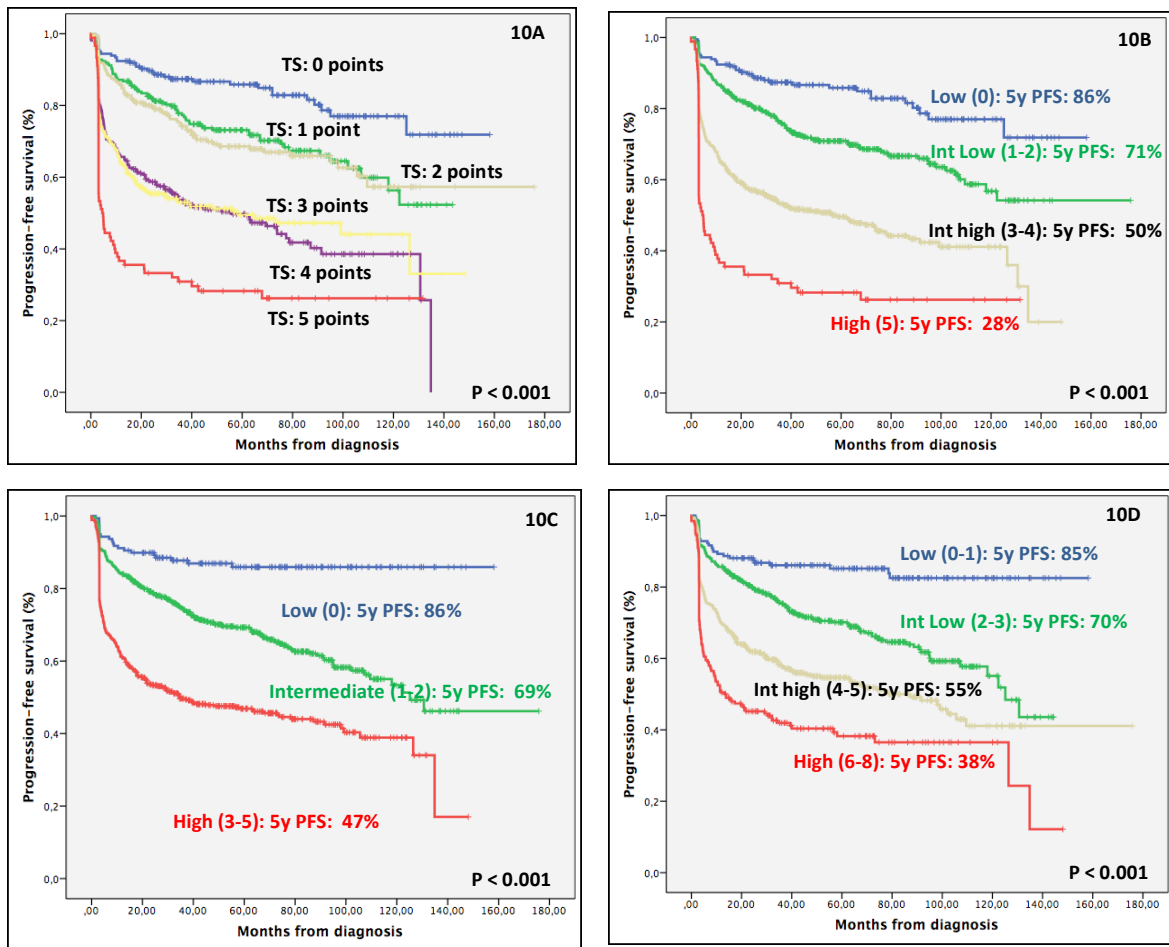
LDH elevada	1,29 (1,06-1,58)	0,011	1,30 (1,02-1,66)	0,032
ECOG PS > 1	1,47 (1,22-1,78)	<0,001	1,78 (1,42-2,22)	<0,001
Afectación extranodal > 1	1,09 (0,88-1,36)	0,41	1,07 (0,83-1,38)	0,62
Síntomas B	1,28 (1,06-1,56)	0,012	1,35 (1,07-1,71)	0,01
Masa voluminosa	1,32 (1,1-1,59)	0,003	1,32 (1,06-1,64)	0,013
B2M elevada	1,23 (1,01-1,5)	0,044	1,45 (1,14-1,86)	0,003

El TS revisado en la era del Rituximab (R-TS) sigue siendo un índice predictivo que claramente identifica 4 grupos pronósticos diferentes en cuanto a SLP (86%, 71%, 50% y 28%) (Figura 10A y 10B) y a SG (93%, 83%, 64% y 40%) a los 5 años. Se objetiva un grupo de alto riesgo con un peor pronóstico (SLP a los 5 años de 28% y mediana de SLP de únicamente 4 meses). Estas cifras contrastan favorablemente con los grupos de alto riesgo del R-IPI y NCCN-IPI: SLP a los 5 años de 47% y 38%, respectivamente (Figura 10C y 10D); e igualan al del GELTAMO-IPI con una SLP a los 5 años del 29%. Estos 4 grupos de riesgo del R-TS representaron 15%, 38%, 40% y 7% de nuestra serie, mientras que el grupo de alto riesgo del R-IPI, NCCN-IPI y GELTAMO-IPI fueron del 45%, 8% y 14% en las series originales(10)(21).

En relación a la respuesta, estos 4 grupos también demostraron una reducción de las tasas de RC desde el 95% en el grupo de bajo riesgo hasta un 47% en el grupo de alto riesgo, en comparación con las tasas de RC observadas en el grupo de alto riesgo del IPI (70%), NCCN-IPI (62%) o GELTAMO-IPI (55%). Incluso considerando la SG, el R-TS podría mejorar el grupo de alto riesgo con una SG a los 5 años del 40% en comparación con el 60% del R-IPI y 48% del NCCN-IPI e igualando al GELTAMO-IPI (40%).

La comparación del TS y otros índices pronósticos (IPI, NCCN-IPI o GELTAMO-IPI) demostró un índice C similar en nuestra serie: 0,67 versus 0,66, 0,66 y 0,67, respectivamente (p=NS). Sin embargo, el TS obtuvo una mejor discriminación del subgrupo de alto riesgo que el IPI y NCCN-IPI, tanto para SLP, SG como para la tasa de RC.

Figura 10: SLP con el uso de TS (10A), R-TS (10B), R-IPI (10C) y NCCN-IPI (10D)



Supervivencia en relación al TS mejorado:

En la serie de descubrimiento, las variables anteriormente mencionadas fueron categorizadas en 3 categorías como muestran las Figuras 11A-11F: estadio AA (I, II y III-IV) (Figuras 11A y 11B), B2M normalizada (0-1,13; >1,13-2,43 y >2,43) (Figuras 11C y 11D) y LDH normalizada (0-0,82; 0,82-2,67 y >2,67) (Figura 11E y 11F). El modelo obtenido en la serie de descubrimiento se confirmó en la serie de validación (Figura 12A y 12B).

Con estas modificaciones, el nuevo TS mejorado pudo identificar un grupo de alto riesgo con una SLP a los 5 años del 23% y 22%, respectivamente, en la serie de descubrimiento y validación. Los grupos bajo, intermedio-bajo e intermedio-alto tenían una SLP a los 5 años del 85%, 69% y 50%, respectivamente (Figura 12A y 12B). Además, el grupo de alto riesgo del TS mejorado tiene una supervivencia muy pobre en términos de SG con una supervivencia a los 5 años del 35% y que también mejora la identificación del grupo de alto riesgo en comparación con el R-IPI que presenta una

SG a los 5 años del 60% en el mismo grupo de pacientes. La comparación del TS mejorado y otros índices (IPI, TS y NCCN-IPI) demostró una mejor discriminación medida con el índice C para SLP en nuestra serie: 0,67 versus 0,65 ($p=0,026$), 0,67 versus 0,65 ($p<0,001$) y 0,67 versus 0,64 ($p=0,007$), respectivamente.

Figura 11: TS original y con la categorización de las 3 variables en la serie de descubrimiento: Estadio (11A y 11B), LDH (11C y 11D) y B2M (11E y 11F)

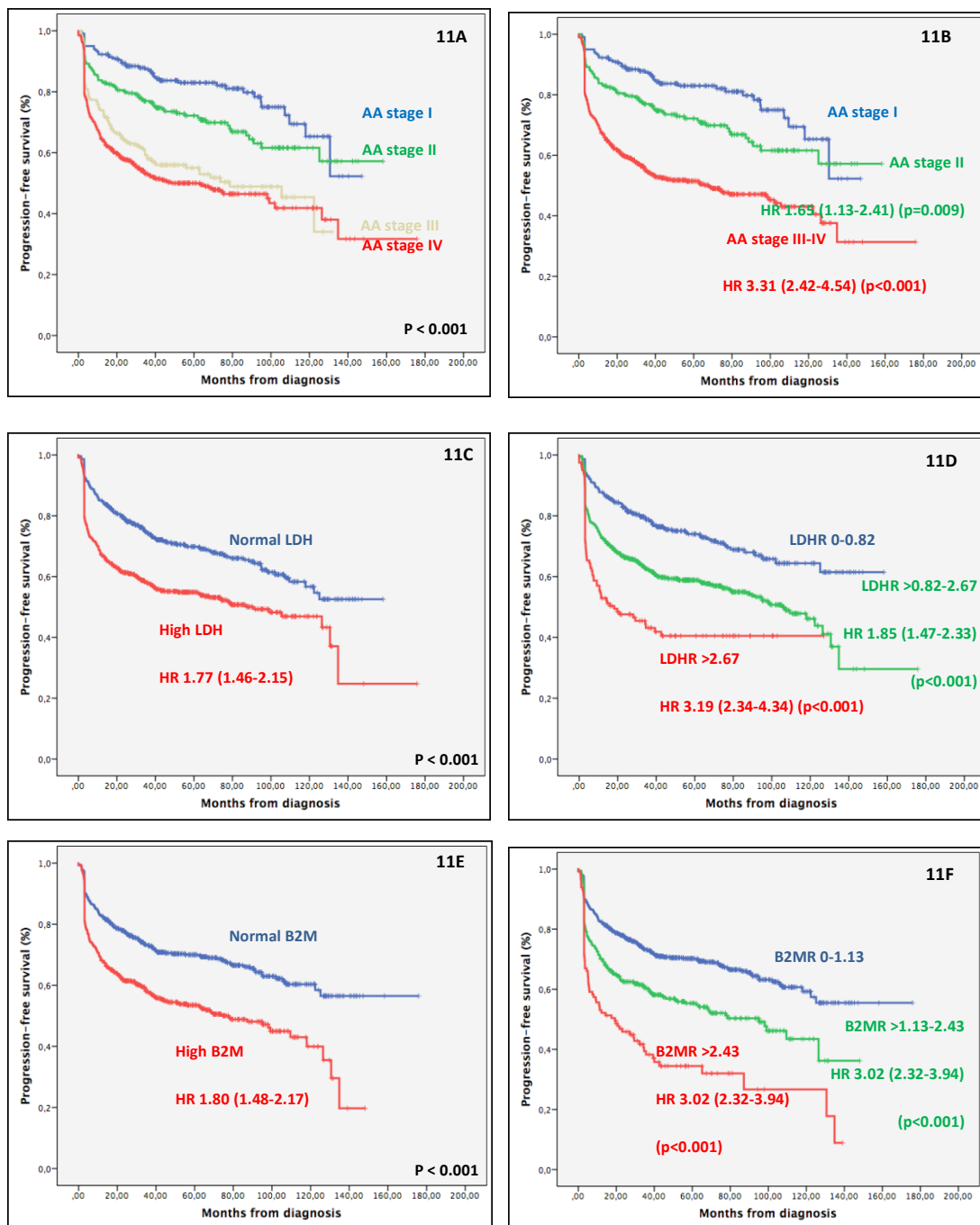
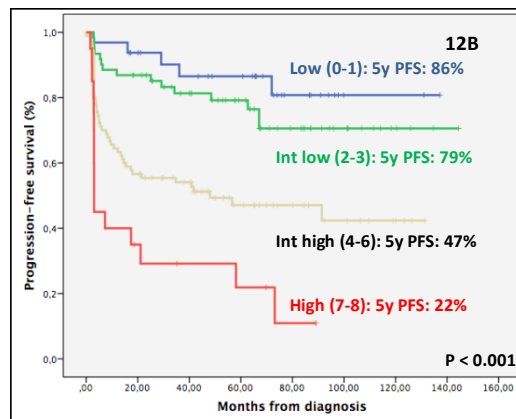
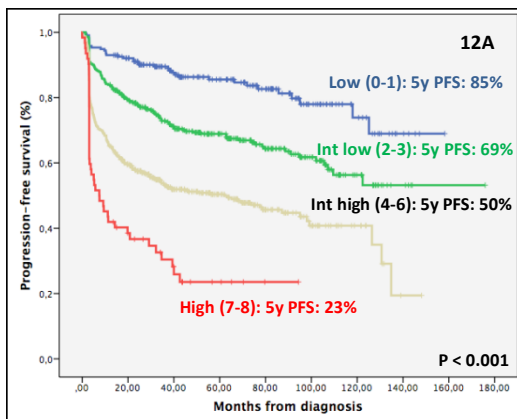


Figura 12: SLP con el empleo del TS mejorado en la serie de descubrimiento (12A) y validación (12B)



Inclusión de las variables del hemograma en un nuevo índice pronóstico:

Características de los pacientes y estudio univariante:

Se analizaron de forma retrospectiva un total de 992 pacientes. Las principales características de los pacientes se resumen en la Tabla 8. La mediana de edad al diagnóstico fue de 64 años (rango 18-91) y la mediana de seguimiento fueron 55 meses (rango 12-185). Para la serie global, la tasa de respuestas globales fue del 90% y la tasa de RC fue del 79%. La SLP y SG a los 5 años fueron del 61% y 74%, respectivamente. El análisis de supervivencia con los factores pronósticos clínicos estándar y las nuevas variables a estudio se muestra en la Tabla 9. El RAL, RAM, RLM, RDW, B2M y el resto de las características analizadas se asociaron significativamente con la SLP.

Tabla 8: Características de los pacientes

	Grupo global (n=992)	Serie descubrimiento (n=780)	Serie validación (n=212)	p
Mediana edad (rango)	64 (18-91)	64 (18-91)	64 (18-85)	1
Sexo M/F (%)	498 (50%) / 489 (50%)	406 (52%) / 370 (47%)	92 (43%) / 119 (56%)	0,03
ECOG-PS > 1	287 (30%)	232 (30%)	55 (26%)	0,27
Estadio III-IV	604 (61%)	480 (62%)	124 (58%)	0,38
Síntomas B	383 (39%)	305 (39%)	78 (37%)	0,63
LDH elevada	556 (58%)	448 (60%)	108 (53%)	0,11
Localización extranodal > 1	179 (18%)	135 (17%)	44 (21%)	0,27
Masa voluminosa	297 (32%)	232 (31%)	65 (33%)	0,67
B2M elevada	440 (49%)	363 (52%)	77 (39%)	0,003

Tabla 9: Análisis de supervivencia incluyendo los factores pronósticos clínicos estándar y las nuevas variables

	SLP-5a	p	SG-5a	p
--	---------------	----------	--------------	----------

Edad: - 0-60 - >60-75 - >75	70% (65-74) 60% (55-65) 44% (36-52)	<0,001	83% (82-83) 74% (69-79) 54% (45-61)	<0,001
Sexo: - Masculino - Femenino	63% (55-65) 59% (54-64)	0,022	71% (67-75) 77% (73-81)	0,03
ECOG-PS: - 0-1 - 2 - 3-4	66% (62-70) 53% (46-60) 33% (22-44)	<0,001	80% (77-83) 65% (58-72) 43% (32-54)	<0,001
Estadio AA: - I-II - III-IV	74% (69-75) 52% (48-56)	<0,001	86% (86-86) 66% (62-70)	<0,001
Síntomas B: - No - Sí	70% (70-71) 45% (39-50)	<0,001	82% (79-85) 60% (54-65)	<0,001
LDH: - 0-1 - >1-2 - >2	80% (73-85) 69% (62-76) 52% (48-56)	<0,001	84% (79-88) 70% (65-75) 61% (54-68)	<0,001
Localización extranodal: - 0-1 - > 1	64% (60-67) 44% (36-52)	<0,001	77% (73-79) 61% (60-62)	<0,001
Masa voluminosa: - No - Sí	63% (63-64) 52% (51-53)	<0,001	76% (72-79) 69% (63-75)	0,019
B2M: - Normal - Elevada	71% (66-75) 52% (47-57)	<0,001	85% (81-88) 64% (59-68)	<0,001
RLM: - >2,25 - 0-2,25	71% (66-74) 50% (45-55)	<0,001	80% (77-84) 67% (62-71)	<0,001
RAL: - ≥1,1 - <1,1	69% (65-73) 51% (46-56)	<0,001	79% (76-83) 68% (63-72)	<0,001
RAM: - 0-0,79 - >0,79	66% (65-66) 51% (45-57)	<0,001	77% (74-81) 67% (49-84)	<0,001
RDW: - 0-0,96 - >0,96	69% (65-73) 50% (44-54)	<0,001	80% (76-84) 65% (60-70)	<0,001

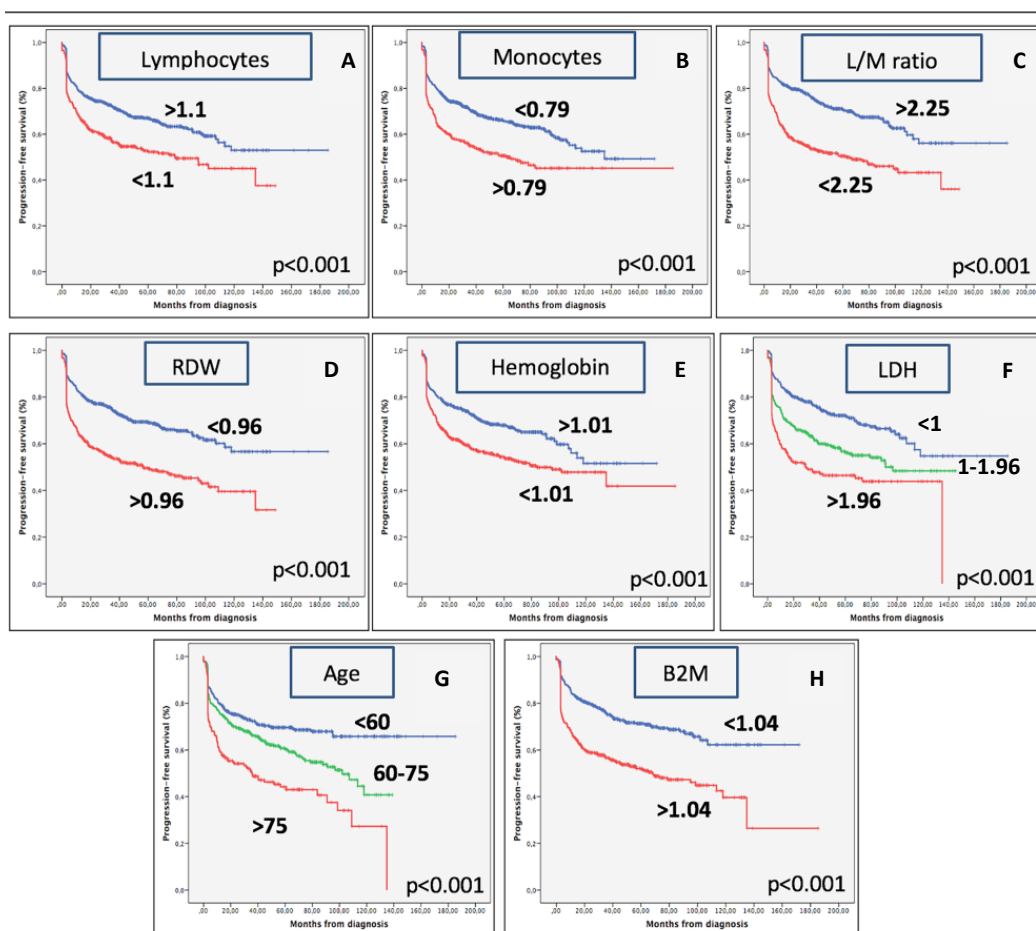
Hemoglobina:				
- Normal	68% (63-72)	<0,001	81% (77-85)	<0,001
- Por debajo de lo normal	54% (49-59)		67% (62-71)	

Generación del nuevo modelo pronóstico:

Tras dividir la serie en las cohortes de descubrimiento y validación, se obtuvieron 2 grupos de pacientes con similares características clínicas (Tabla 8). Sin embargo, la serie de descubrimiento tenía más varones y más pacientes con B2M elevada de forma significativa.

Los puntos de corte óptimos de las variables cuantitativas se determinaron con el método de MAXSTAT: RAL 1,1; RAM 0,79; RLM 2,25; RDW 0,96; hemoglobina 1,01; ratio LDH 1 y 1,96; edad 60 y 75 y B2M 1,04 (Figura 13).

Figura 13: Puntos de cortes de las variables cuantitativas

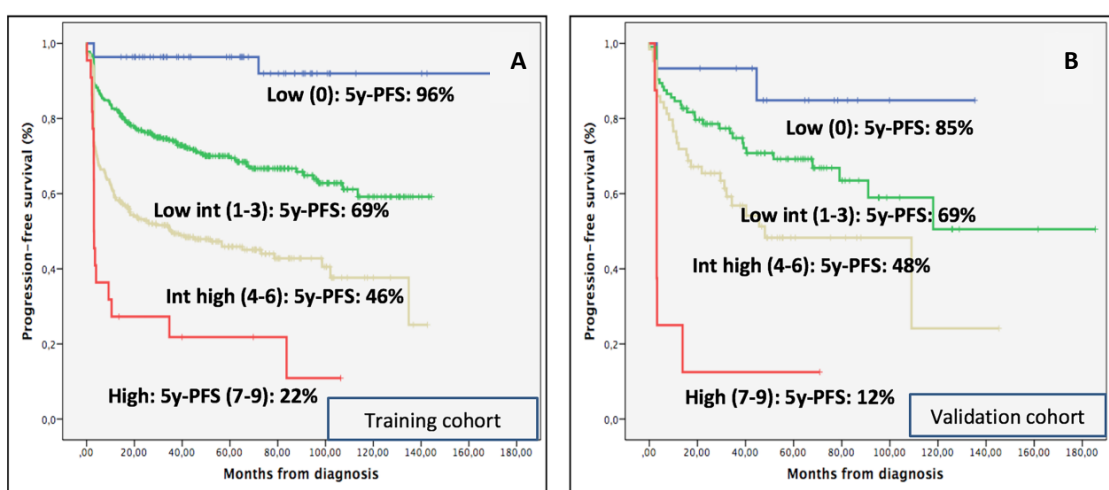


En el estudio multivariante, la edad, ECOG PS pobre, estadio III-IV, masa voluminosa, B2M elevada, RLM <2,25 y RDW >0,96 fueron los factores pronósticos independientes para una peor SLP. Para el diseño del nuevo modelo para predecir la SLP se emplearon estas 7 variables con significación independiente. El modelo se puntuó de la siguiente forma (Tabla 10): Edad, 0, 1 y 2 puntos; ECOG PS, 0 y 2 puntos; estadio AA II-IV, masa voluminosa, B2M elevada, RLM <2,25 y RDW >0,96; 0 o 1 punto cada uno. Con la suma de todas las puntuaciones de cada variable se obtuvo una puntuación de 0 a 9. Se crearon 4 grupos de riesgo en función de la forma generada con las curvas de Kaplan-Meier para SLP: Bajo riesgo (0 puntos), bajo-intermedio (1-3), intermedio-alto (4-6) y alto riesgo (7-9). Este índice pronóstico fue validado con la cohorte de validación (Figura 14).

Tabla 10: Generación del nuevo índice considerando las variables independientes del análisis multivariante para SLP en la serie de descubrimiento

Nuevo índice	HR (IC 95%)	p	Puntos
Edad:			
<60 años	---	---	0
60-75 años	1,36 (1,01-1,83)	0,045	1
>75 años	2,09 (1,51-2,9)	<0,001	2
ECOG-PS:			
0-2	---	---	0
3-4	2,34 (1,63-3,38)	<0,001	2
Estadio III-IV	1,48 (1,1-2)	0,011	1
Masa voluminosa	1,55 (1,2-2)	0,001	1
B2M alta	1,44 (1,1-1,9)	0,009	1
RLM <2,25	1,39 (1,07-1,8)	0,013	1
Ratio RDW >0,96	1,39 (1,07-1,8)	0,014	1

Figura 14: Cohorte de descubrimiento y validación

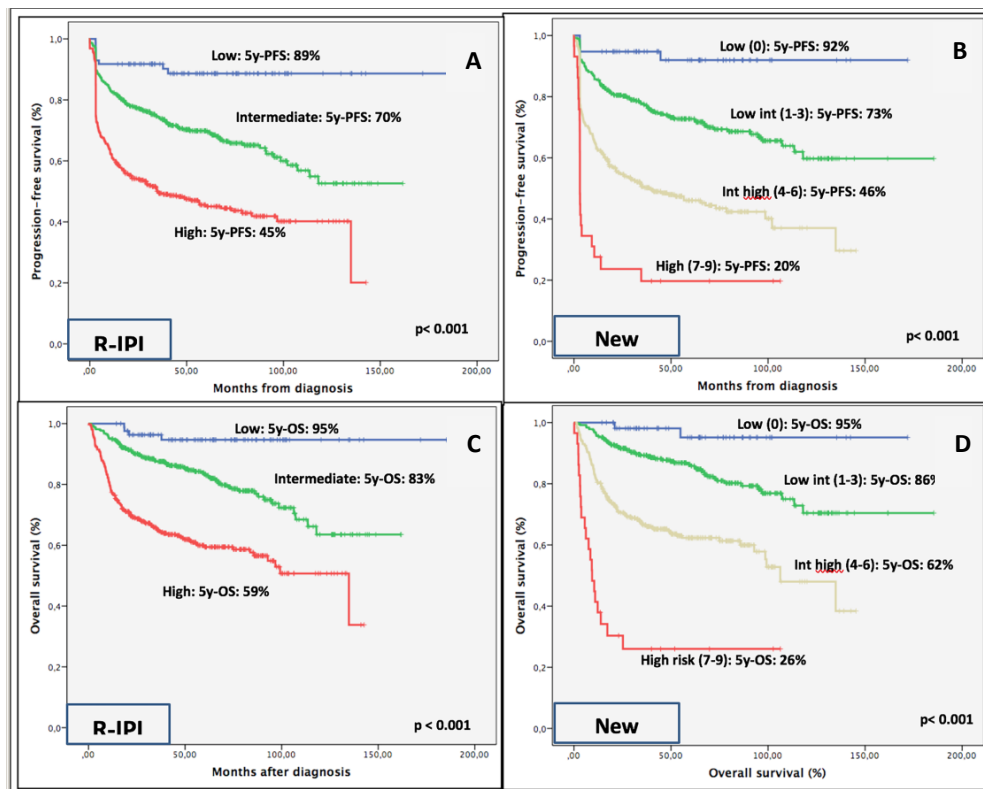


Comparación del nuevo índice con los índices ya reportados:

El nuevo índice mostró mejor discriminación que el IPI tanto para SLP como SG (Figura 15). Con este nuevo modelo, el grupo de peor pronóstico (alto) presentó una SLP a los 5 años del 19% y una SG a los 5 años del 24% a diferencia del R-IPI con 45% y 59%, respectivamente. Asimismo, se observó una mejor discriminación del grupo de alto riesgo con el nuevo índice en comparación con los otros previamente descritos como el TS, NCCN-IPI y GELTAMO-IPI(10)(21) (22), con una SLP y SG a los 5 años del 32%, 38%, 29% y 45%, 46%, 40%, respectivamente.

El nuevo índice demostró una mayor capacidad discriminativa que el IPI para SLP (índice C, 0,69 para el nuevo modelo versus 0,65 para el IPI, $p=0,002$) y SG (índice C, 0,73 para el nuevo modelo versus 0,67 para IPI, $p=0,018$).

Figura 15: Comparación del nuevo modelo con R-IPI



Papel pronóstico de los miRNAs en el LBDCG

Características de los pacientes:

Se extrajeron de forma retrospectiva los datos diagnósticos y clínicos de 156 pacientes tratados de forma homogénea con R-CHOP con o sin radioterapia procedentes de nuestro centro (N=113), HSLL (N=25) y HM (N=18). Las características de los pacientes se resumen en la Tabla 11.

Tabla 11: Características generales de los pacientes

	N=156
Mediana de edad (rango)	60 (15-87)
Sexo (M/F)	85/71
ECOG PS >1	34 (22%)
Estadio AA	88 (56%)
Síntomas B	51 (33%)
LDH elevada	74 (47%)
>1 afectación extranodal	27 (17%)
Masa voluminosa	57 (36%)
alPI >1	62 (40%)
R-IPi desfavorable	50 (32%)
NCCN-IPi	
Bajo	26 (16%)
Bajo-intermedio	62 (39%)
Alto-intermedio	49 (32%)
Alto	11 (7%)
B2M elevada	63 (40%)
Radioterapia	54 (35%)

Obtención de muestras e identificación de los miRNAs con papel pronóstico:

Se obtuvieron un total de 96 muestras de tejido en parafina apto para la realización de los cortes de tejido y posterior extracción de ARN:

- 69 muestras del HUSE
- 19 muestras del HSLL
- 8 muestras del HM

Para poder identificar aquellos miRNAs con implicación pronóstica se empleó una serie de descubrimiento de 12 pacientes en la que todos los casos presentaban mal pronóstico con alta carga tumoral y enfermedad avanzada (estadio III-IV y R-IPI desfavorable (>2)). Sobre esta base de mal pronóstico se definieron dos grupos totalmente contrapuestos desde el punto de vista de su respuesta al tratamiento y evolución:

- Grupo quimiorresistente (n=6): Formado por refractarios o bien recaídas antes de los 12 meses desde el inicio del tratamiento
- Grupo quimiosensible (n=6): Formado por pacientes que obtuvieron una remisión completa duradera (al menos 3 años)

Las características clínicas de la serie de descubrimiento para identificación de miRNAs con expresión diferencial en quimiorresistencia se resumen en la Tabla 12.

Tabla 12: Características clínicas de la serie de descubrimiento

	Refractarios/Recaída precoz (RR)	RC
N	6	6
Edad (mediana&rango)	50 (38-78)	44 (30-72)
Sexo (M/F)	3/3	4/2
ECOG PS >1	5 (83%)	3 (50%)
Estadio III-IV	6 (100%)	6 (100%)
Síntomas B	5 (83%)	5 (83%)
LDH elevada	6 (100%)	5 (83%)
Sitio extranodal >1	3 (50%)	1 (17%)
Enfermedad voluminosa	2 (33%)	2 (33%)
a-IPI >1 (desfavorable)	6 (100%)	6 (100%)
B2M elevada	3 (50%)	5 (83%)
Radioterapia	2 (33%)	0 (0%)
SG a 5 años	0%	100%
Mediana de SLP (IC95%)	7,6 (2,1-11,4)	NA

La tasa de respuestas de ambos subgrupos fue:

- Respuesta inicial: 100% en el grupo de RC y 83% en el grupo de RR.
- Recaída: 0% en grupo de RC y 100% en grupo de RR.

Realización de los microarrays de miRNAs:

Se llevó a cabo un clustering jerárquico en el que se identificaron 26 miRNAs (Tabla 13).

Tabla 13: Descripción de los 26 miRNAs diferencialmente expresados entre el grupo RR versus RC

miRNAs	Cambio de expresión (Fold change)
hsa-miR-199a-5p	4,88
hsa-miR-1244	4,76
hsa-miR-182-5p	4,74
hsa-miR-6840-3p	4,18
hsa-miR-20b-5p	3,75
hsa-miR-17-3p	3,73
hsa-miR-19b-3p	3,27
hsa-miR-1273d	3,2
U67	3,07
hsa-miR-18b-5p	2,84
hsa-miR-1231	2,84
U8	2,81
hsa-miR-193b-5p	2,73
HBII-336	2,65
hsa-miR-18a-5p	2,65
hsa-miR-6806-5p	2,52
hsa-miR-3928	2,48
hsa-miR-6772-5p	2,46
hsa-miR-885-3p	2,36
U15B	2,32
hsa-miR-8085	2,25
hsa-miR-1180-3p	2,2
hsa-miR-483-5p	2,08
U14B	2,04

hsa-miR-6857-3p	-2,04
hsa-miR-6789-3p	-2,09

Realizamos el screening de microRNAs en base a su cambio de expresión (Fold change) y vías implicadas con el que obtuvimos 10 microRNAs diferencialmente expresados en el subgrupo de RR. La selección de los miRNAs se resume en la Tabla 14.

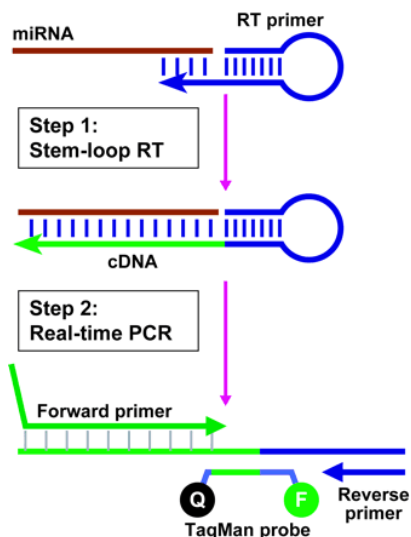
Tabla 14: Selección de miRNAs para análisis en la serie global

miRNA	Cambio de expresión (Fold change)
hsa-miR-17-3p	3,2
hsa-20b-5p	4,6
hsa-miR-1244	6,74
hsa-6840-3p	3,09
hsa-miR-1231	2,8
hsa-miR-193b-5p	3,08
hsa-miR-6806-5p	2,17
hsa-miR-885-3p	2,17
hsa-miR-182-5p	4,74
hsa-miR-199a-5p	4,88

Posteriormente se llevó a cabo la validación de los microRNAs con expresión diferencial a través de RT-PCR cuantitativa en la serie global. El objetivo era valorar los miRNAs identificados en una serie grande homogéneamente tratada. Este grupo de validación finalmente incluyó 68 muestras con material adecuado para la realización de RT-PCR. Mediante la RT-PCR se procedió a (Figura 16):

- Paso de cDNA a través de RT loop
- Cuantificación a través de RT-PCR con primers específicos y sondas SybrGreen (EPIK miRNA Select Lo-ROX kit)
- Categorización usando curvas de ROC para el evento recaída/progresión

Figura 16: Representación del procedimiento llevado a cabo por la RT-PCR



Validación de los miRNAs seleccionados en la serie global:

La Tabla 15 muestra el análisis univariante de supervivencia incluyendo los factores pronósticos clínicos estándar de la serie y la expresión por RT-PCR de los 10 miRNAs seleccionados. Se puede observar que, de ellos, 7 mostraron una influencia significativa sobre la SLE (miR-20b-5p, miR-1244, miR-6840-3p, miR-1231, miR-193b-5p, miR-6860-5p y miR-199a-5p) y 6 sobre la SG (miR-1244, miR-1231, miR-193b-5p, miR-885-3p, miR-182-5p y miR-199a-5p) (Tabla 16).

El miRNA-20b-5p, perteneciente al cluster mir-17-92, se expresó 4,6 veces más que el grupo de RC y en nuestra serie tuvo un impacto significativo sobre la SLE.

Tabla 15: Análisis univariante de supervivencia incluyendo variables clínicas y biológicas de nuestra serie de validación

	SG-7a (IC95%)	p	SLE-7a (IC95%)	p
Edad:				
0-60	74% (58-91)	0,1	64% (46-81)	0,14
>60	61% (43-79)		51% (33-70)	
Sexo:				
Masculino	78% (65-92)	0,25	63% (47-78)	0,76
Femenino	56% (36-77)		53% (33-74)	
ECOG PS:				
0-1	75% (62-88)	0,037	66% (52-80)	0,027
2-4	48% (23-74)		34% (9-59)	
Estadio AA:				
I-II	83% (69-97)	0,067	74% (58-89)	0,08
III-IV	58% (40-75)		46% (28-64)	

Síntomas B: No Sí	79% (66-91) 47% (23-71)	0,019	68% (53-82) 37% (13-61)	0,026
LDH: Normal Elevada	75% (57-94) 60% (42-77)	0,072	69% (49-88) 48% (31-66)	0,03
Afectación extraganglionar: 0-1 > 1	71% (57-84) 58% (27-90)	0,61	58% (44-72) 58% (27-90)	0,79
Enfermedad voluminosa: No Sí	67% (52-81) 73% (53-94)	0,78	58% (42-74) 58% (36-81)	0,85
B2M: Normal Elevada	78% (64-92) 58% (35-80)	0,072	67% (51-83) 51% (29-73)	0,097
R-IPi: Favorable Intermedio Desfavorable	100% 72% (55-88) 49% (27-72)	0,01	100% 62% (45-80) 39% (17-61)	0,008
TS: 0-2 3-5	82% (69-94) 44% (21-66)	0,005	72% (57-86) 37% (16-59)	0,007
Radioterapia: Sí No	95% (87-100) 55% (39-71)	0,024	86% (71-100) 45% (28-61)	0,02
DIR: 100-85% <85%	75% (62-88) 48% (20-76)	0,002	67% (52-81) 33% (9-59)	<0,001
miR-1244: 0-0,31 >0,31	77% (64-90) 53% (30-76)	0,024	72% (58-87) 32% (9-56)	0,005
miR-193: 0-0,27 >0,27	84% (72-97) 51% (30-71)	0,009	79% (64-93) 34% (14-53)	<0,001
miR-1231: 0,215 >0,215	80% (67-93) 51% (28-73)	0,02	75% (60-89) 29% (2-55)	0,001
miR-20b-5p: 0-0,6 >0,6	78% (61-95) 63% (46-79)	0,21	73% (54-92) 49% (32-65)	0,046
miR-17-3p: 0-0,06 >0,06	57% (20-94) 70% (57-83)	0,35	21% (0-56) 62% (48-76)	0,053
miR-182-5p: 0-0,065 >0,065	92% (78-100) 61% (47-76)	0,043	52% (34-70) 62% (42-82)	0,12
miR-199a-5p: 0,7 >0,7	81% (67-95) 55% (36-74)	0,035	69% (53-86) 45% (26-64)	0,04

miR-6840-3p: 0-0,41 >0,041	69% (55-84) 67% (45-89)	0,72	68% (53-82) 33% (9-57)	0,01
miR-885-3p: 0-0,285 >0,285	79% (65-94) 52% (32-73)	0,008	70% (45-95) 52% (36-67)	0,12
miR-6860-5p: 0-0,245 0,245	72% (56-87) 65% (45-84)	0,43	69% (54-85) 42% (20-63)	0,019

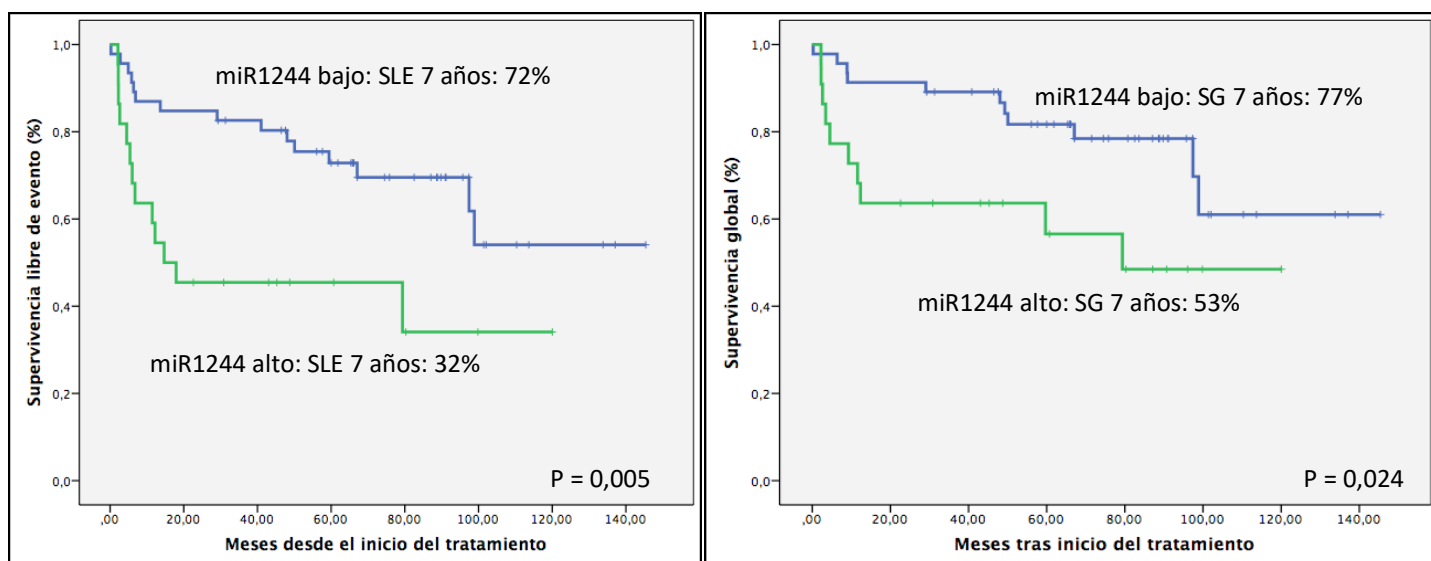
De los 10 miRNAs testados sólo 3 tuvieron un papel pronóstico significativo tanto para SLP, SG como para SLE que fueron hsa-miR-1244, hsa-miR-1231 y hsa-miR-193b-5p (Tabla 16).

Tabla 16: miRNAs con influencia significativa sobre la SG, SLE y SLP

miRNAs	Papel en SG/SLE/SLP
hsa-miR-17-3p	No / No / SLP
hsa-20b-5p	No / SLE / No
hsa-miR-1244	SG / SLE / SLP
hsa-6840-3p	No / SLE / SLP
hsa-miR-1231	SG / SLE / SLP
hsa-miR-193b-5p	SG / SLE / SLP
hsa-miR-6860-5p	No / SLE / SLP
hsa-miR-885-3p	SG / No / No
hsa-miR-182-5p	SG / No / No
hsa-miR-199a-5p	SG / SLE / No

A continuación, se detalla la correlación clínico-biológica de estos 3 miRNAs:

1. miRNA-1244:

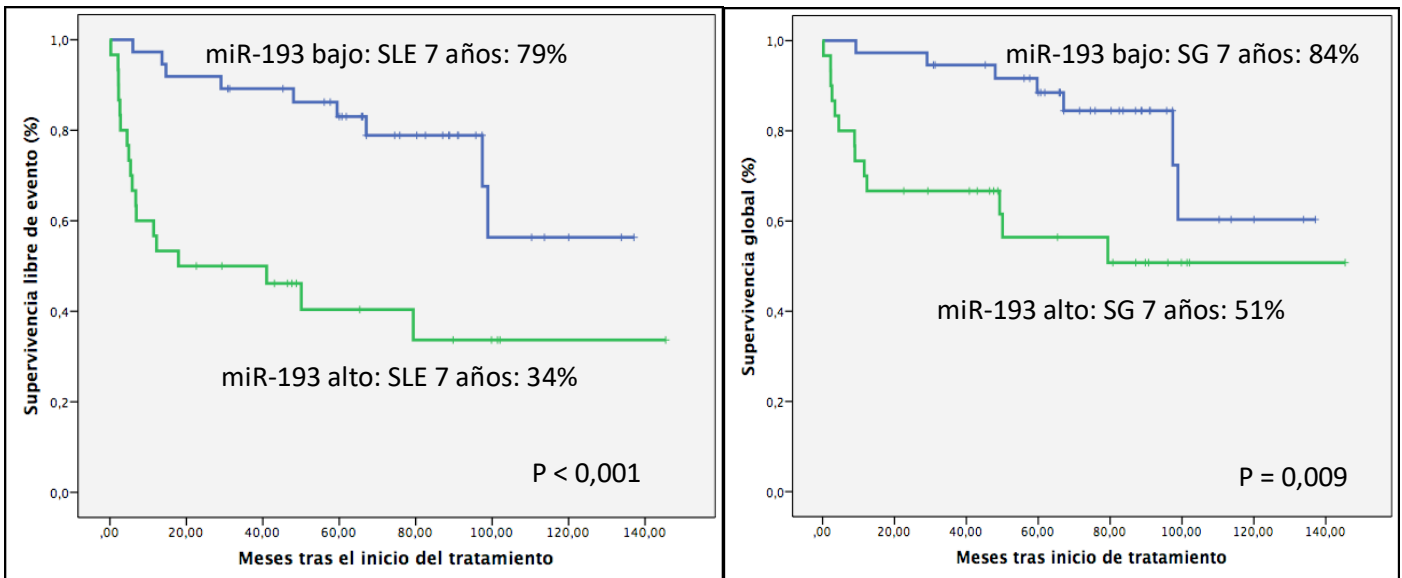


	HR (IC 95%)	p
SLE	2,79 (1,31-5,91)	0,008
SG	2,61 (1,1-6,18)	0,029

Este miRNA fue el que obtuvo mayor cambio de expresión (Fold change): 6,74. En nuestra serie, y teniendo en cuenta los datos clínicos, la sobreexpresión de este miRNA se asoció con:

- Mayor extensión de la enfermedad (III-IV) (p=0,01)
- Presencia de síntomas B (p=0,005)
- Peores factores pronósticos clínicos del TS (p=0,026)

2. miRNA-193-5p

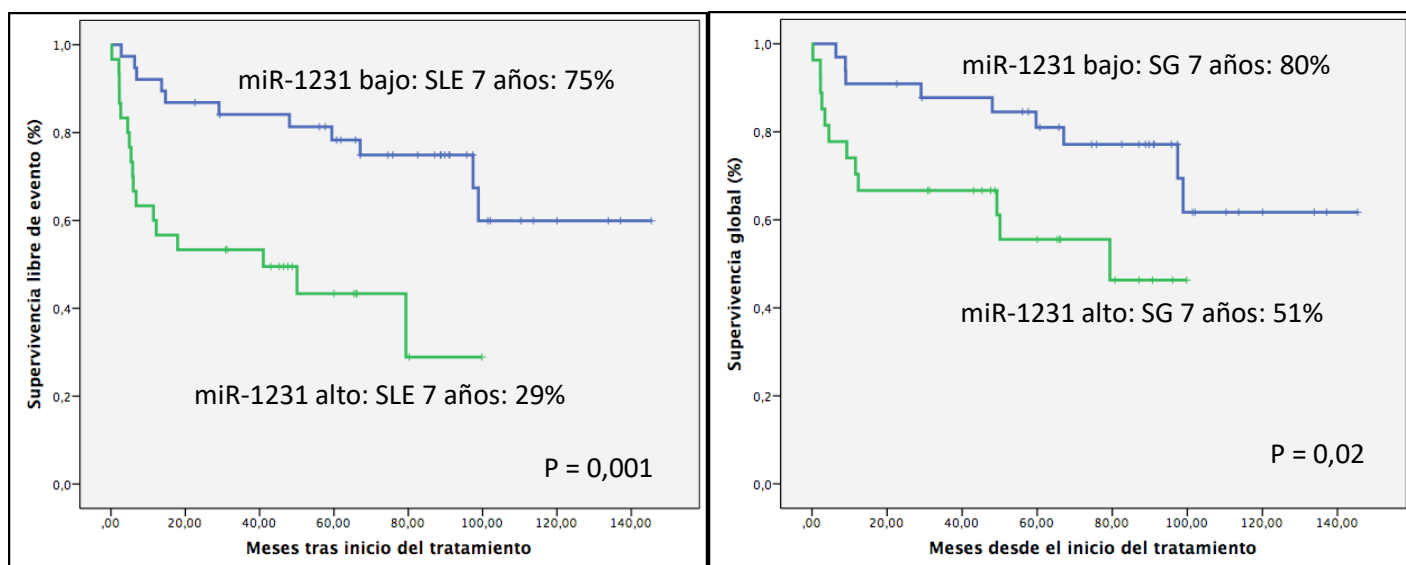


	HR (IC 95%)	p
SLE	3,98 (1,77-8,94)	0,001
SG	3,21 (1,27-8,09)	0,013

El miRNA-193-5p obtuvo un cambio de expresión (Fold change) de 3,08. Se confirmó que la sobreexpresión de este miRNA presentaba una asociación clínica con:

- Casos con más factores pronósticos adversos clínicos como:
 - LDH ($p=0,003$) y B2M ($p=0,004$) aumentadas
 - VSG elevada ($p=0,041$)
 - Síntomas B ($p=0,019$)
 - IPI ($p=0,028$)
 - TS ($<0,001$)
- Peor estado general (ECOG) ($p=0,009$)

3. miRNA-1231



	HR (IC 95%)	p
SLE	3,59 (1,63-7,92)	0,002
SG	2,61 (1,1-6,17)	0,029

Confirmamos que este miRNA tuvo en nuestra serie un papel independiente de variables clínicas estándar y de los otros miRNAs. Se realizó un análisis multivariante tanto con las variables clínicas como biológicas (Tabla 17) y se observó que la sobreexpresión de miRNA-1231 junto con presentar un R-IPI de alto riesgo o una reducción de DIR mayor del 15% se asociaron de forma independiente a una peor SG y SLE.

Tabla 17: Análisis multivariante incluyendo variables clínicas y biológicas de la serie de validación por RT-PCR

SLE		
Variable	HR (IC 95%)	p
R-IPI alto	3,8 (1,7-8,5)	0,001
Reducción de DIR >15%	4,3 (1,9-9,6)	<0,001
miR-1231	5,6 (2,3-13,6)	<0,001
SG		
R-IPI alto	4,2 (1,7-10,4)	0,002
Reducción de DIR >15%	4,7 (1,9-11,8)	0,001
miR-1231	4,4 (1,6-12,2)	0,004

Discusión

Dosis intensidad relativa

El esquema R-CHOP21 sigue siendo el tratamiento estándar en pacientes con LBDCG. Estudios fase III recientes tanto del grupo francés(4) como británico(17) han confirmado que un aumento en la dosis densidad no conlleva una mejora en la supervivencia. No se observaron diferencias en términos de SLP o SG entre R-CHOP21 y R-CHOP14(4)(17). En nuestra serie tampoco encontramos diferencias con ambos regímenes confirmando una supervivencia similar (Figura 8).

Asimismo, el grupo francés comprobó que el R-CHOP14 era más tóxico y que había más dificultades en mantener la DIR(4). En nuestra serie, la reducción de la DIR mostró una tendencia a ser más alta en el grupo de R-CHOP14 (9,2% versus 5,8% en el grupo de R-CHOP21) ($p=0,094$). El grupo francés publicó una mediana de reducción de la DIR de en torno a un 12% en la cohorte de R-CHOP14, y de un 2% para R-CHOP21 ($p<0,001$)(4). El estudio británico, en cambio, confirmó similar mediana de reducción de la DIR entre ambos grupos(17). Sin embargo, en ambos ensayos la mediana de la DIR de R-CHOP14 de todas las drogas importantes en comparación con R-CHOP21 fue del 134% y 150%, respectivamente. Teniendo la misma eficacia ambos regímenes, la consecuencia directa es que la reducción de la RDI parece tener más relevancia en el grupo de R-CHOP21 que en el de R-CHOP14.

La DIR supone un problema relevante en Oncología. Numerosos estudios han analizado su papel en el cáncer de mama y en otras enfermedades como el linfoma Hodgkin(121)(122). La dosis intensidad (DI) representa la cantidad (mg/m²) de un fármaco administrada por unidad de tiempo (semanas) y la DIR refleja como la DI se implementó según lo planeado. Múltiples trabajos han publicado la correlación entre la DIR y el pronóstico.

En 1990 el impacto de la DIR en LBDCG fue descrito empleando el régimen R-CHOP u otros con una intensidad mayor(123). Tras la adición del Rituximab al esquema CHOP (R-CHOP), otra publicación describió que la mortalidad se influenciaba por la DIR(124). En este trabajo, se emplearon numerosos cortes para definir la reducción de la DIR: 25%, 15% y la mediana de la DIR. En nuestro trabajo, seleccionamos un 15% dado que es el corte más usado en los estudios de DIR, tanto para linfoma como para tumores sólidos. Además, probamos varios cortes y finalmente éste era el más adecuado para un valor clínico balanceado y para una mayor potencia estadística.

Según lo esperado, en nuestra serie la reducción de la DIR únicamente tuvo un impacto en el grupo de R-CHOP21, pero no en el de R-CHOP14 (Figura 9). Además, en el grupo de R-CHOP21, una reducción mayor del 15% en la DIR se asoció de forma independiente tanto con SG como SLP, también con el R-IPi influyendo independientemente a la SG. Sin embargo, la reducción de la DIR no tuvo impacto en el grupo de R-CHOP14. De hecho, pacientes con o sin una reducción mayor del 15% en la DIR tuvieron una SG a los 5 años del 82% y 79% ($p=0,82$) y una SLP a los 5 años del 65% y 82% ($p=0,12$), respectivamente.

En la mayoría de los ensayos clínicos, la DIR se mantiene de forma satisfactoria. Sin embargo, por diversos motivos en la práctica clínica no siempre es fácil hacerlo. El primer paso para resolver este problema, es darse cuenta de que existe y el segundo es analizar sus causas y las potenciales soluciones. Con este estudio hemos demostrado que en el pasado en nuestro centro tuvimos este problema, dado que el 31% de los pacientes que presentaron una reducción mayor del 15% en la DIR les fue peor que a aquellos sin esta reducción en el grupo de R-CHOP21, pero no para el 34% con la misma reducción que recibieron R-CHOP14. Además, esto fue independiente de los factores pronósticos clínicos estándar.

Las razones para estas reducciones en la DIR fueron: edad avanzada, comorbilidades, toxicidad hematológica u otras complicaciones como infecciones, problemas sociales o dificultades logísticas con las fechas de los ciclos. En nuestra cohorte de R-CHOP21, la mitad de estas reducciones estuvieron relacionadas con la edad y comorbilidades, pero también con toxicidad, incluyendo infecciones que pueden ser anticipadas o monitorizadas de forma estrecha. Los pacientes mayores, en ocasiones, no reciben la misma dosis intensidad o densidad que los pacientes jóvenes. Lyman et al publicó numerosos factores pronósticos independientes de la reducción de dosis intensidad: edad mayor de 60 años, estadio avanzado, PS pobre y el no emplear profilaxis con factor estimulantes de granulocitos (G-CSF)(125). Llamativamente, la edad no fue un factor de riesgo significativo en aquellos pacientes que recibieron G-CSF.

Con esto en la mente y considerando el riesgo de la toxicidad hematológica, son necesarios modelos predictivos basados en los factores de riesgo identificados para la reducción de la DIR y de esta manera decidir el tratamiento de soporte adecuado, incluyendo la administración de factor estimulantes de granulocitos que facilita la administración de la dosis completa de quimioterapia. Zelenetz(126), identificó la edad avanzada, albúmina baja, presencia de alteración hepática, infiltración medular por la

enfermedad y/o bajos neutrófilos al diagnóstico como factores predictores de alto riesgo de neutropenia en el primer ciclo de quimioterapia y, por tanto, potencial riesgo de menor dosis intensidad. Intragumtornchai et al(127) propusieron otro modelo para predecir la neutropenia severa tras el primer ciclo de CHOP en LNH agresivos sin tener en cuenta la edad. En este modelo, la presencia de albúmina baja, LDH alta e infiltración medular por el linfoma predijeron una tasa de un 72% de neutropenias febriles con las dosis plenas del esquema CHOP.

Otros estudios se centraron en la posibilidad de recibir las dosis completas de las drogas en pacientes con edad avanzada empleando factores estimuladores de colonias asumiendo que esta estrategia tendrá un impacto en la supervivencia(128). Teniendo en cuenta toda esta evidencia, las guías recomiendan el uso de G-CSF en pacientes mayores que reciben el tratamiento con intención de curación(119). Los factores estimulantes se tendrían que administrar en aquellos pacientes que reciban quimioterapia y que presenten un riesgo de neutropenia febril $\geq 20\%$ o en aquellos pacientes en los que se asocie mal pronóstico con la reducción de dosis densidad o intensidad.

La Doxorrubicina es un fármaco clave en el tratamiento de este tipo de linfoma pero en ocasiones su uso está limitado en pacientes con edad avanzada por su cardiotoxicidad(129). Hersman et al(130) demostraron que los pacientes mayores diagnosticados de LBDCG que recibían Doxorrubicina eran más proclives a padecer fallo cardíaco crónico, objetivando la hipertensión como el único factor de riesgo sinérgico con este fármaco. Se ha empleado una formulación de Doxorrubicina menos cardiotóxicas como la liposomal, que es menos tóxica pero con eficacia similar(131).

Por último, los problemas sociales o logísticos en el calendario también generan reducciones en la DIR. Algunos se asociaron con el propio paciente y otros con el sistema sanitario: listas de espera o exceso de trabajo. En ambos casos, la clave es que tanto el paciente como el médico reconozcan la importancia de la DIR en pacientes con LBDCG tratados con R-CHOP21.

Comparación de los nuevos índices con los índices estándar

Se han propuesto numerosos índices pronósticos para categorizar e identificar aquellos pacientes con LBDCG con peores resultados con el tratamiento estándar y que podrían ser candidatos a ser tratados con nuevos esquemas o fármacos. El más importante y mayormente usado es el IPI(9) propuesto en 1993 y posteriormente validado en la era de Rituximab (R-IPI)(10). Se emplearon 5 variables clínicas (edad, LDH, número de territorios extranodales, estadio y ECOG PS) para estratificar 4 grupos de riesgo que fueron reducidos a 3 con el R-IPI. Sin embargo, a pesar de ser un buen índice, carece de la habilidad de identificar un grupo de muy alto riesgo en la era de Rituximab: el grupo de alto riesgo del R-IPI tiene una SG y SLP a los 4 años mayor del 50%. En los últimos años, se han hecho esfuerzos para intentar mejorar la capacidad discriminativa del IPI, como el NCCN-IPI(21). Este índice, en comparación con el R-IPI, incorporó la subcategorización de la edad y LDH obteniendo una mayor capacidad para discriminar los grupos de bajo y alto riesgo(21)(132). Con el mismo objetivo, el Grupo Español de Linfoma (GELTAMO) publicó recientemente el GELTAMO-IPI(22), incluyendo todas las variables del IPI con una subcategorización de la edad y el ECOG PS así como la B2M.

En 1992, el MD Anderson Cancer Center, reportó el TS teniendo en cuenta variables pronósticas exclusivamente relacionadas con el tumor: LDH elevada, estadio AA III-IV, B2M elevada, masa voluminosa y presencia de síntomas B(12). Se identificaron 2 subgrupos pronósticos: bajo riesgo (0-2, SLF a los 3 años del 83%) versus alto riesgo (≥ 3 , SLF a los 4 años del 24%). Uno de nuestros análisis dentro de la tesis se ha centrado en validar este índice en la era de Rituximab. Para ello, desde la base nacional de LBDCG del GELTAMO (n=2156) se seleccionaron de forma retrospectiva 1327 pacientes que hubieran recibido tratamiento de primera con R-CHOP, que tuvieran todas las variables del IPI y TS disponibles y que tuvieran al menos 1 año de seguimiento. Esta serie de pacientes homogéneamente tratados representa la vida real, dado que los pacientes fueron reclutados desde distintos hospitales nacionales, sin sesgos de selección y sin inclusión sistemática en ensayos clínicos.

Como ya se ha mencionado con anterioridad, el TS está enriquecido con 3 variables relacionadas con el tumor y no presentes en el IPI: masa voluminosa, síntomas B y B2M. Los niveles altos de B2M se han asociado con situaciones inflamatorias tanto sistémicas como focales(14) así como con enfermedades linfoides malignas que presentan alta carga tumoral. En consecuencia, niveles altos de B2M son factores pronósticos adversos relacionados con el tumor y/o el huésped. Numerosos trabajos

han confirmado el papel pronóstico de la B2M en pacientes con LBDCG tanto en la era pre(12)(133) como post-Rituximab(14)(134). La adición de la B2M a las principales variables del IPI, mejora la estratificación de riesgo tal y como lo confirmó el recientemente publicado GELTAMO-IPI(22)(135). La presencia de síntomas B (fiebre >38°C, pérdida de peso >5% o sudoración nocturna) es un factor adverso conocido en pacientes con LNH. Se ha relacionado con niveles aumentados de proteínas inflamatorias como la proteína C reactiva(136) y citoquinas como la interleukina-6(137)(138). Asimismo, pacientes con niveles aumentados de marcadores inflamatorios presentan un peor pronóstico en términos de tasa de respuesta y supervivencia(139).

Por otra parte, numerosos estudios tanto en la era pre y post-Rituximab han demostrado el papel pronóstico adverso de la enfermedad de voluminosa(12)(140). Esto fue analizado en el ensayo MabThera International Trial (MInT), en el que el papel pronóstico adverso de la masa voluminosa disminuyó, aunque no se contrarrestó totalmente, en pacientes jóvenes con LBDGC de buen pronóstico tratados con Rituximab. El TS original consideró 7 cm como punto de corte para considerar masa voluminosa, pero el estudio MInT definió 10 cm de diámetro máximo del tumor como punto de corte óptimo(140). De hecho, en nuestra serie, la mayoría de los centros usaron el corte de 10 cm y esta variable presentó una significación estadísticamente significativa para SLP y SG.

En nuestra serie, encontramos que todas las variables del TS original y todas excepto una (>1 localización extranodal) del IPI, mantuvieron su significación independiente tanto para SLP como SG. Estos resultados coinciden con otras numerosas series reportadas en la era Rituximab, particularmente cuando las otras variables relevantes del IPI están presentes en el modelo(21)(22). El Rituximab generó una mejoría significativa en pacientes con linfomas B. Cualquier cambio en la supervivencia modifica la evaluación pronóstica. Esto ocurrió con el IPI cuando se reevaluó post-Rituximab en donde la categorización se modificó desde 4 a 3 grupos de riesgo con el R-IPI. Sin embargo, el principal problema fue que los pacientes de alto riesgo tuvieron una PFS o SG mayor del 50%. Por tanto, en la era Rituximab, es necesario identificar pacientes con peor pronóstico que puedan ser candidatos a recibir tratamientos alternativos al estándar con R-CHOP.

En nuestro estudio, el R-TS demostró un cambio de 2 a 4 grupos pronósticos identificables (11A y 11B). Pero el punto más importante fue que se pudo encontrar un subgrupo de muy mal pronóstico con una SLP a los 5 años del 28% y con únicamente

una mediana de SLP de 4 meses, obteniendo una mejoría significativa en la identificación de subgrupos de muy alto riesgo. Por otra parte, generamos un TS mejorado a través de una subcategorización de 3 de las variables originales del TS. Con este nuevo índice, podemos identificar un subgrupo de alto riesgo del 22%, que mejora claramente la evaluación de riesgo en LBDCG. Hay que recalcar, que la identificación de este subgrupo de alto riesgo se obtiene con variables fácilmente obtenibles en el momento del diagnóstico, sin necesidad de marcadores traslacionales más complejos. Sin embargo, se tendrían que testar nuevos factores pronósticos relacionados con el tumor, como la célula de origen o la translocación de MYC y BCL2, entre otras, para así incorporarlos a los índices pronósticos clínicos y guiarnos en la decisión terapéutica. Tanto el R-TS como el TS mejorado podrían constituir puntos de partida o andamios sobre los que incorporar estos biomarcadores dependientes de tumor en el futuro.

La significación pronóstica de las variables del hemograma se ha confirmado en el ámbito de los tumores sólidos(23). En el contexto de los linfomas, hay una evidencia creciente de que el microambiente tumoral y la inmunidad del huésped juegan un papel importante en la progresión(24).

Estudios retrospectivos han confirmado el papel del RAL al diagnóstico para predecir la supervivencia en LBDCG(25)(26) y se ha reportado que un alto RAL en el momento del diagnóstico se asocia con mejor PFS y SG, de forma independiente del IPI. Concretamente, Kim et al demostraron un impacto significativo del RAL $<1000/uL$ en la SLE y SG en pacientes tratados con CHOP o R-CHOP(141). Se confirmó una SG a los 2 años del 80% para pacientes con RAL alto, a diferencia de un 46% con RAL bajo.

Asimismo, se ha investigado el número de monocitos detectados en sangre periférica sugiriendo que podría afectar a la patogénesis y pronóstico de esta enfermedad(28). El RAM se considera un marcador indirecto del microambiente tumoral. Promueve el crecimiento y supervivencia de las células B malignas, directamente mediante mediadores solubles(142) o factores tróficos(143), e indirectamente mediante la supresión de la inmunidad antitumoral del huésped y la promoción de la angiogénesis del tumor(144). A diferencia del RAL, el alto RAM, por tanto, tiene el efecto opuesto y es un factor de mal pronóstico en pacientes con LBDCG.

El ratio RLM determinado al diagnóstico podría ser un factor pronóstico en pacientes con LBDCG(29)(30). Wilcox et al describieron un índice incluyendo el RLM en el IPI que estratificaba a los pacientes en 3 grupos de riesgo(31), y Li et al emplearon un RLM inverso (ratio monocitos/linfocitos) al diagnóstico en su estudio con resultados

similares(145). En nuestro estudio, confirmamos que RLM más bajos predijeron tanto SLP como SG más cortas.

El recuento de plaquetas y los niveles de hemoglobina también han sido reportados como marcadores pronósticos para LBDCG(41)(146). Nuestros resultados, en cambio, no demostraron que la SLP y SG se vieran influenciadas de forma independiente por el recuento de plaquetas o los niveles de hemoglobina.

El RDW es el coeficiente de la variación del volumen de los eritrocitos circulantes y se mide de forma rutinaria en la práctica clínica como parte del hemograma. Recientemente, se ha visto que el RDW podría jugar un papel en la carcinogénesis y en la progresión tumoral(45). A pesar de que los mecanismos que subyacen en la relación entre el RDW y la supervivencia o actividad de la enfermedad está controvertida, se ha asociado con una variedad de marcadores inflamatorios(46). El papel de la inflamación en la generación del linfoma ha sido extensamente reconocido e investigado. La generación e invasión del LBDCG depende de múltiples interacciones entre el tumor y las células no neoplásicas y a su vez su interacción con el estroma circulante y el microambiente(147). Varios estudios han confirmado que el niveles elevados de RDW en el hemograma al diagnóstico predicen un pronóstico desfavorable en pacientes con LBDCG(47). En nuestra serie, El RDW fue una variable independiente tanto para SLP como SG.

En nuestro estudio, presentamos un nuevo índice que incluyó el RLM, RDW y la B2M junto con otras variables clínicas. Estas 3 variables demostraron predecir una SLP más corta. Se generó así un nuevo modelo pronóstico basado en el RLM, RDW y B2M en combinación con edad, ECOG-PS, estadio y masa voluminosa, demostrando una mejor discriminación del riesgo que el IPI y capaz de identificar un grupo de muy alto riesgo con una SLP y SG a los 5 años del 19% y 24%, respectivamente.

Como hemos comentado con anterioridad, en los últimos años numerosos marcadores citogenéticos han demostrado un impacto en el pronóstico del LBDCG como las translocaciones que afectan al gen MYC(74). El pronóstico adverso de las translocaciones de MYC aumenta con la presencia de translocaciones de BCL2 y/o BCL6. Estos linfomas DH tienen un pronóstico muy agresivo y una respuesta pobre al tratamiento estándar(77). Por otra parte, los perfiles de expresión génica para la determinación de la célula de origen son una herramienta genómica que determina al menos 3 subgrupos moleculares: CG, ABC y primario mediastínico(108). Desafortunadamente, muchas de estas técnicas no son aplicables en la práctica clínica diaria o requieren tiempo para la obtención de resultados. Por ese motivo, con

la generación de este nuevo índice, se hace hincapié en la importancia de herramientas fácilmente disponibles en el momento del diagnóstico, como las variables del hemograma o la B2M.

Papel pronóstico de los miRNAs en LBDCG

Determinados miRNAs se han identificado como predictores de supervivencia en múltiples enfermedades malignas como leucemia linfática crónica(91), leucemia mieloide aguda (LMA)(148)(149) o tumores sólidos(150). Dado que los miRNAs son menos susceptibles a la degradación que el ARNm por su menor longitud(151), su expresión parece ser más robusta para la determinación de la célula de origen de múltiples cánceres. Estudios preliminares confirmaron que miRNAs específicos predecían el pronóstico de pacientes con LBDCG(110). Sin embargo, estos estudios fueron llevados a cabo en series pequeñas que requieren validación en series independientes con mayor número de pacientes.

En relación a la selección de los miRNAs con implicación pronóstica en LBDCG, los estudios publicados en los últimos años se han basado en la expresión diferencial de potenciales miRNAs en base a SG, célula de origen, tejido normal, comparación entre diversas histologías o se han seleccionado miRNAs ya identificados en otras neoplasias (Tabla 18).

Tabla 18: Selección de los miRNAs en los estudios reportados

N muestras	Modo de selección miRNAs	Autores	Año
80	Comparación con linfoma folicular	Lawrie et al(107)	2009
61	Comparación con ganglio linfático normal	Malumbres et al(152)	2009
258	Comparación entre célula de origen y SG	Montes-Moreno et al(113)	2011
176	Selección de miRNAs identificados en estudios previos	Alencar et al(112)	2011
61	Selección de miRNA identificado en otros tumores	Berglund et al(153)	2013
106	Comparación con hiperplasia	Wu et al(154)	2014

	linfoide reactiva		
62	Comparación con ganglio linfático normal	Chen et al(155)	2014
58	Comparación con tejido gástrico normal y células mononucleadas de sangre periférica	He et al(156)	2014
200	Comparación con ganglio linfático normal	Go et al(157)	2015
112	Selección de miRNA identificado en estudios previos	Li et al(158)	2015
81	Comparación con células B periféricas, células B CG, tejido de linfadenitis y 4 líneas celulares de linfoma	Tropan et al(159)	2015
72	Comparación con hiperplasia linfoide reactiva	Huang et al(160)	2019

En nuestro trabajo, a diferencia del resto de series reportadas, la selección de los miRNAs se realizó en base a la presencia o no de resistencia al tratamiento de primera línea. Para ello, se empleó una serie de descubrimiento de 12 pacientes en la que todos ellos presentaban mal pronóstico con alta carga tumoral y enfermedad avanzada. El principal objetivo era confirmar si estos pacientes habían presentado recaída/refractariedad (SLP pobre) versus RC duradera. En base a esto, se establecieron 2 grupos (quimiorresistente y quimiosensible). Se identificaron los miRNAs con expresión diferencial en los 2 grupos y finalmente se seleccionaron los 3 miRNAs que tuvieron un papel pronóstico tanto para SLP, SLE como para SG (miRNA-1244, miRNA-193-5p, miRNA-1231).

Hasta la fecha, se han identificado firmas de miRNAs que caracterizan los linfomas y se ha indagado en su desarrollo, clasificación y regulación de genes. Los más conocidos son el cluster miR-17-92, miR-155, miR-21 y miR-34(99). El cluster miR-17-92, que codifica 6 diferentes miRNAs (miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-20a, miR-19b-1 y miR-92a-1), está localizado en el cromosoma 13q31-q32, una región frecuentemente amplificada en el subtipo CG(99). Se ha relacionado con aumento de la proliferación y concretamente, en el LBDCG subtipo CG, con la supresión de PTEN y disregulación de la vía PI3k/AKT/mTOR. En nuestra serie 2 miRNAs de este cluster (el miR-20b-5p y

el miR-17-3p) tuvieron impacto pronóstico: en el 1º caso sobre la SLE y en el 2º sobre la SLP.

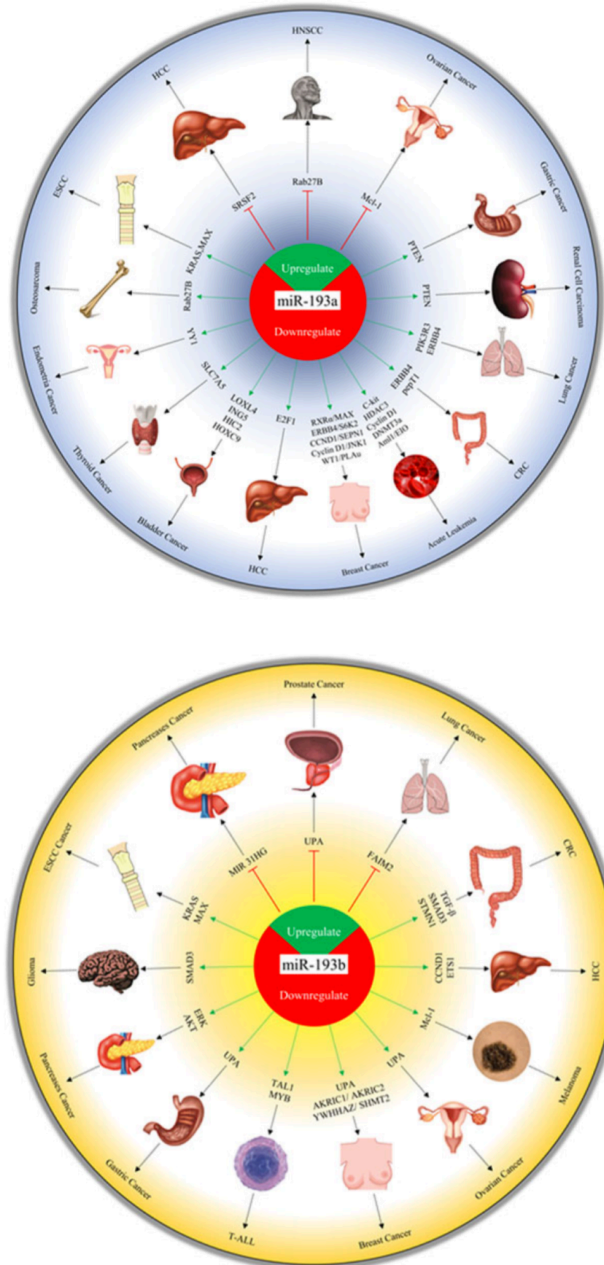
En nuestro estudio, identificamos por primera vez, 3 miRNAs con impacto pronóstico tanto para SLE como SG en pacientes con LBDCG. El miRNA-1244 fue el que obtuvo mayor cambio de expresión (Fold change) en nuestra serie. En la literatura se ha descrito actividad del miRNA-1244 como potencial target en linfomagénesis tanto en LBDCG como en linfoma de Burkitt(161). Los eventos moleculares proliferativos en los que interviene son la sobreexpresión de c-myc y en la regulación positiva de la antiapoptosis(162). Xiong et al demostraron que la mayoría de genes target de los miRNAs identificados estaban involucrados en la vía de señalización de Myc. Concretamente, recogieron de la literatura 21 Myc-miRNAs con expresión diferencial entre células normales y células cancerígenas. Finalmente, identificaron que la mayoría de los Myc-miRNAs involucrados en los cánceres relacionados con la vía de señalización del Myc, 12 de 17, estaban anormalmente expresados en los correspondientes cánceres. La función de los 5 restantes todavía no está reportada en la literatura. Entre ellos, se encuentra el miR-1244-1 además del miR-940, miR-548h-2, miR-26a-2 y miR-330. Nuestro trabajo pudo demostrar por primera vez, la implicación pronóstica de miRNA-1244 tanto en SLE como en SG en LBDCG. Además, pudo confirmar su impacto en distintas características clínicas, dado que su sobreexpresión se asoció con mayor extensión de la enfermedad (estadio III-IV), presencia de síntomas B y peores factores pronósticos clínicos del TS.

Además de la implicación en la vía de señalización de Myc, el miRNA-1244 se ha relacionado con la sobreexpresión de E2F que confiere mal pronóstico en cáncer de próstata por tener resistencia a la hormonoterapia(163) y la regulación positiva de la antiapoptosis(162).

El 2º miRNA con papel pronóstico identificado en nuestro estudio es el miRNA-193-5p. Se ha descrito un papel pronóstico adverso del miRNA-193-5p en carcinoma escamoso de cabeza y cuello(164). Concretamente, se confirmó una inhibición de NF-1 que a su vez inhibía a ERK. Esto conllevó una sobreexpresión de ERK con el consiguiente aumento de la proliferación del tumor(164). Por otra parte, este estudio también identificó a PER2 como otro potencial target de miRNA-193-5p. El PER2 es un gen supresor de tumor involucrado en la regulación del ritmo circadiano que controla procesos celulares como proliferación, apoptosis, metabolismo y reparación de ADN. La inhibición de PER2 que inhibe a c-myc conlleva a la consiguiente

sobreexpresión de c-myc. Recientemente, se ha reportado su implicación pronóstica en otros múltiples cánceres (Figura 17)(165).

Figura 17: Implicación del miRNA-193a en la proliferación de diferentes cánceres



Como se observa en la figura, el miRNA-193 es un target en múltiples neoplasias en humanos y predominantemente actúa como supresor tumoral. Sin embargo, puede promover tumorigénesis siendo el target de SRSF2, Rab27B y Mcl-1 en carcinoma hepatocelular, carcinoma escamoso de cabeza y cuello y carcinoma de ovario, respectivamente. Asimismo, actúa como target de miR31HG, uPA y FAIM2 en cáncer de páncreas, próstata y pulmón, respectivamente.

En relación a las neoplasias hematológicas, su actividad se ha reportado en mieloma múltiple(166). Asimismo, varios investigadores sugieren que el silenciamiento de miR-193a-3p junto con la hipermetilación de ADN está claramente asociado con la fusión de AML1/ETO expresado en las células hematopoyéticas en pacientes con LMA(167). El miR-193-3p suprime la proliferación celular de las células de LMA, inhibiendo la expresión de c-kit, que es un onco-miRNA que codifica una glicoproteína transmembrana perteneciente a la familia del receptor tipo III de tirosin kinasa. La inhibición del crecimiento celular junto con la inducción de la apoptosis y diferenciación fueron identificados cuando la metilación de ADN se inhibió y se redujo el target c-kit en las células de LMA(168).

Nuestro estudio reportó por primera vez, la implicación pronóstica del miRNA-193-5p en linfoma, concretamente su sobreexpresión se asoció tanto con peor SLE como SG. Asimismo, se confirmó que la sobreexpresión de este miRNA presentaba una asociación con casos con más factores pronósticos adversos clínicos como LDH, B2M y VSG aumentadas, síntomas B, IPI y TS de alto riesgo y peor estado general.

Por último, el 3º miRNA identificado en nuestro estudio fue el miRNA-1231. Este miRNA fue el único que obtuvo un papel pronóstico independiente de variables clínicas estándar y de los otros miRNAs en el estudio multivariante. Se ha descrito su participación en el control de infecciones virales como hepatitis B (VHB)(169). Este miRNA tiene como diana al ARNm del core del VHB. De esta manera, suprime la replicación viral y las infecciones crónicas por VHB conllevan una sobreexpresión sostenida del miR-1231(170). Por otra parte, se ha visto un papel oncogénico en el cáncer de páncreas(171) y en glioma(172).

Nuestro trabajo, identificó por primera vez, el papel pronóstico de este miRNA en linfoma, concretamente en LBDCG. Su sobreexpresión predijo una peor SLE y SG.

Conclusiones

DIR:

- El impacto negativo de la reducción de la DIR en la respuesta y supervivencia se observó únicamente en el grupo de R-CHOP21, pero no en los pacientes tratados con R-CHOP14.
- Para pacientes que reciben R-CHOP21 recomendamos medidas de soporte adecuadas de cara a evitar las reducciones de la DIR.

Validación del TS en la era Rituximab:

- En la era Rituximab, todas las variables incluidas en el TS original mantienen un papel pronóstico independiente y el TS conserva una discriminación similar en comparación con los índices pronósticos estándar.
- El TS y el TS mejorado demostraron una mejor identificación de los pacientes de alto riesgo en comparación con el IPI o el NCCN-IPI.

Inclusión de las variables del hemograma en un nuevo índice pronóstico:

- Se presenta por primera vez, un índice pronóstico incluyendo las variables del hemograma (RLM y RDW) y la B2M, que es fácilmente obtenible en la práctica diaria.
- Con este nuevo índice pronóstico se confirmó un mejor poder discriminativo tanto para SLP y SG en comparación con los índices pronósticos estándar.

Papel pronóstico de los miRNAs en LBDCG:

- A través de un grupo de descubrimiento centrado en progresión/refractariedad, detectamos un grupo de miRNAs novedosos diferencialmente expresados en casos de quimio-resistencia.
- El miRNA-1244, miRNA-193-5p y miRNA-1231 altos se asociaron a casos con mayor extensión de la enfermedad, peores factores pronósticos clínicos y peor supervivencia.
- A nivel molecular estos miRNAs se han relacionado con eventos proliferativos, antiapoptosis y vías de linfomagénesis alternativas no descritas (miR-1231) potencialmente relacionadas con infecciones virales como VHB.

Bibliografía

1. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood* [Internet]. 2016;127(20):2375-90. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26980727>
2. 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* [Internet]. 2002/01/25. 2002;346(4):235-42. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11807147>
3. Pfreundschuh M, Trümper L, Osterborg A, Pettengell R, Tmenny M, Imrie K, et al. CHOP-like chemotherapy plus rituximab versus CHOP-like chemotherapy alone in young patients with good-prognosis diffuse large-B-cell lymphoma: a randomised controlled trial by the MabThera International Trial (MInT) Group. *The Lancet Oncology* [Internet]. mayo de 2006;7(5):379-91. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16648042>
4. Delarue R, Tilly H, Mounier N, Petrella T, Salles G, Thieblemont C, et al. Dose-dense rituximab-CHOP compared with standard rituximab-CHOP in elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma (the LNH03-6B study): a randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* [Internet]. 2013/04/13. 2013;14(6):525-33. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23578722>
5. Micallef INM, Maurer MJ, Wiseman GA, Nikcevich DA, Kurtin PJ, Cannon MW, et al. Epratuzumab with rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone chemotherapy in patients with previously untreated diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* [Internet]. 13 de octubre de 2011;118(15):4053-61. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21673350>
6. Ruan J, Martin P, Furman RR, Lee SM, Cheung K, Vose JM, et al. Bortezomib plus CHOP-rituximab for previously untreated diffuse large B-cell lymphoma and mantle cell lymphoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* [Internet]. 20 de febrero de 2011;29(6):690-7. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21189393>
7. Nowakowski GS, LaPlant B, Macon WR, Reeder CB, Foran JM, Nelson GD, et al. Lenalidomide combined with R-CHOP overcomes negative prognostic impact of non-germinal center B-cell phenotype in newly diagnosed diffuse large B-Cell lymphoma: a phase II study. *Journal of clinical oncology : official journal of*

- the American Society of Clinical Oncology [Internet]. 20 de enero de 2015;33(3):251-7. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25135992>
8. Dunleavy K, Roschewski M, Wilson WH. Precision treatment of distinct molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma: ascribing treatment based on the molecular phenotype. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. octubre de 2014;20(20):5182-93.
 9. A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project. *N Engl J Med* [Internet]. 1993/09/30. 1993;329(14):987-94. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8141877>
 10. Sehn LH, Berry B, Chhanabhai M, Fitzgerald C, Gill K, Hoskins P, et al. The revised International Prognostic Index (R-IPI) is a better predictor of outcome than the standard IPI for patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *Blood* [Internet]. 2006/11/16. 2007;109(5):1857-61. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17105812>
 11. Ziepert M, Hasenclever D, Kuhnt E, Glass B, Schmitz N, Pfreundschuh M, et al. Standard International prognostic index remains a valid predictor of outcome for patients with aggressive CD20+ B-cell lymphoma in the rituximab era. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* [Internet]. 10 de mayo de 2010;28(14):2373-80. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20385988>
 12. Rodriguez J, Cabanillas F, McLaughlin P, Swan F, Rodriguez M, Hagemester F, et al. A proposal for a simple staging system for intermediate grade lymphoma and immunoblastic lymphoma based on the «tumor score». *Ann Oncol* [Internet]. 1992/11/01. 1992;3(9):711-7. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1450060>
 13. Miyashita K, Tomita N, Taguri M, Suzuki T, Ishiyama Y, Ishii Y, et al. Beta-2 microglobulin is a strong prognostic factor in patients with DLBCL receiving R-CHOP therapy. *Leukemia research* [Internet]. 29 de agosto de 2015; Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26350140>
 14. Shinkai S, Chaves PHM, Fujiwara Y, Watanabe S, Shibata H, Yoshida H, et al. Beta2-microglobulin for risk stratification of total mortality in the elderly population: comparison with cystatin C and C-reactive protein. *Archives of*

- internal medicine [Internet]. 28 de enero de 2008;168(2):200-6. Disponible en:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18227369>
15. Fisher RI, Gaynor ER, Dahlborg S, Oken MM, Grogan TM, Mize EM, et al. Comparison of a standard regimen (CHOP) with three intensive chemotherapy regimens for advanced non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* [Internet]. 1993/04/08. 1993;328(14):1002-6. Disponible en:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7680764>
 16. Linch DC, Yung L, Smith P, Maclennan K, Jack A, Hancock B, et al. Final analysis of the UKLG LY02 trial comparing 6-8 cycles of CHOP with 3 cycles of CHOP followed by a BEAM autograft in patients <65 years with poor prognosis histologically aggressive NHL. *Br J Haematol* [Internet]. 2010/03/06. 2010;149(2):237-43. Disponible en:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20201949>
 17. Cunningham D, Hawkes EA, Jack A, Qian W, Smith P, Mouncey P, et al. Rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisolone in patients with newly diagnosed diffuse large B-cell non-Hodgkin lymphoma: a phase 3 comparison of dose intensification with 14-day versus 21-day cycles. *Lancet* [Internet]. 2013/04/26. 2013;381(9880):1817-26. Disponible en:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23615461>
 18. Landgren O, Algernon C, Axdorph U, Nilsson B, Wedelin C, Porwit-MacDonald A, et al. Hodgkin's lymphoma in the elderly with special reference to type and intensity of chemotherapy in relation to prognosis. *Haematologica* [Internet]. 2003/04/19. 2003;88(4):438-44. Disponible en:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12681971>
 19. van Rijswijk RE, Haanen C, Dekker AW, de Meijer AJ, Verbeek J. Dose intensity of MOPP chemotherapy and survival in Hodgkin's disease. *J Clin Oncol* [Internet]. 1989/12/01. 1989;7(12):1776-82. Disponible en:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2585019>
 20. Bosly A, Bron D, Van Hoof A, De Bock R, Berneman Z, Ferrant A, et al. Achievement of optimal average relative dose intensity and correlation with survival in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with CHOP. *Ann Hematol* [Internet]. 2007/10/24. 2008;87(4):277-83. Disponible en:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17952688>

21. Zhou Z, Sehn LH, Rademaker AW, Gordon LI, Lacasce AS, Crosby-Thompson A, et al. An enhanced International Prognostic Index (NCCN-IPI) for patients with diffuse large B-cell lymphoma treated in the rituximab era. *Blood* [Internet]. 6 de febrero de 2014;123(6):837-42. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24264230>
22. Montalbán C, Díaz-López A, Dlouhy I, Rovira J, Lopez-Guillermo A, Alonso S, et al. Validation of the NCCN-IPI for diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL): the addition of $\beta 2$ -microglobulin yields a more accurate GELTAMO-IPI. *British journal of haematology* [Internet]. 2017;176(6):918-28. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28106247>
23. Teramukai S, Kitano T, Kishida Y, Kawahara M, Kubota K, Komuta K, et al. Pretreatment neutrophil count as an independent prognostic factor in advanced non-small-cell lung cancer: an analysis of Japan Multinational Trial Organisation LC00-03. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* [Internet]. julio de 2009;45(11):1950-8. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19231158>
24. Lenz G, Wright G, Dave SS, Xiao W, Powell J, Zhao H, et al. Stromal gene signatures in large-B-cell lymphomas. *The New England journal of medicine* [Internet]. 27 de noviembre de 2008;359(22):2313-23. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19038878>
25. Chae YS, Shin H, Sohn SK, Lee SJ, Moon JH, Kang BW, et al. Absolute lymphocyte count at day + 21 predicts survival in patients with early-stage diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab, cyclophosphamide, adriamycin, vincristine and prednisone. *Leukemia & lymphoma* [Internet]. septiembre de 2012;53(9):1757-63. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22372848>
26. Cox MC, Nofroni I, Ruco L, Amodeo R, Ferrari A, La Verde G, et al. Low absolute lymphocyte count is a poor prognostic factor in diffuse-large-B-cell-lymphoma. *Leukemia & lymphoma* [Internet]. septiembre de 2008;49(9):1745-51. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18798109>
27. Cox MC, Nofroni I, Laverde G, Ferrari A, Amodeo R, Tatarelli C, et al. Absolute lymphocyte count is a prognostic factor in diffuse large B-cell lymphoma. *British journal of haematology* [Internet]. abril de 2008;141(2):265-8. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18353165>

28. Mueller CG, Boix C, Kwan W-H, Daussy C, Fournier E, Fridman WH, et al. Critical role of monocytes to support normal B cell and diffuse large B cell lymphoma survival and proliferation. *Journal of leukocyte biology* [Internet]. septiembre de 2007;82(3):567-75. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17575267>
29. Rambaldi A, Boschini C, Gritti G, Delaini F, Oldani E, Rossi A, et al. The lymphocyte to monocyte ratio improves the IPI-risk definition of diffuse large B-cell lymphoma when rituximab is added to chemotherapy. *American journal of hematology* [Internet]. diciembre de 2013;88(12):1062-7. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23940056>
30. Porrata LF, Ristow KM, Habermann TM, Witzig TE, Colgan JP, Inwards DJ, et al. Peripheral blood absolute lymphocyte/monocyte ratio during rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine and prednisone treatment cycles predicts clinical outcomes in diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia & lymphoma* [Internet]. diciembre de 2014;55(12):2728-38. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24547705>
31. Wilcox RA, Ristow K, Habermann TM, Inwards DJ, Micallef INM, Johnston PB, et al. The absolute monocyte and lymphocyte prognostic score predicts survival and identifies high-risk patients in diffuse large-B-cell lymphoma. *Leukemia* [Internet]. septiembre de 2011;25(9):1502-9. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21606957>
32. Kusumanto YH, Dam WA, Hospers GAP, Meijer C, Mulder NH. Platelets and granulocytes, in particular the neutrophils, form important compartments for circulating vascular endothelial growth factor. *Angiogenesis* [Internet]. 2003;6(4):283-7. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15166496>
33. Templeton AJ, McNamara MG, Šeruga B, Vera-Badillo FE, Aneja P, Ocaña A, et al. Prognostic role of neutrophil-to-lymphocyte ratio in solid tumors: a systematic review and meta-analysis. *Journal of the National Cancer Institute* [Internet]. junio de 2014;106(6):dju124. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24875653>
34. Troppan K, Deutsch A, Gerger A, Stojakovic T, Beham-Schmid C, Wenzl K, et al. The derived neutrophil to lymphocyte ratio is an independent prognostic factor in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *British journal of cancer* [Internet]. 21 de enero de 2014;110(2):369-74. Disponible en:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24357794>

35. Porrata LF, Ristow K, Habermann T, Inwards DJ, Micallef IN, Markovic SN. Predicting survival for diffuse large B-cell lymphoma patients using baseline neutrophil/lymphocyte ratio. *American journal of hematology* [Internet]. noviembre de 2010;85(11):896-9. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20842639>
36. Chen L-P, Lin S-J, Yu M-S. Prognostic value of platelet count in diffuse large B-cell lymphoma. *Clinical lymphoma, myeloma & leukemia* [Internet]. febrero de 2012;12(1):32-7. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22138101>
37. Moullet I, Salles G, Ketterer N, Dumontet C, Bouafia F, Neidhart-Berard EM, et al. Frequency and significance of anemia in non-Hodgkin's lymphoma patients. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* [Internet]. octubre de 1998;9(10):1109-15. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9834824>
38. Chigrinova E, Mian M, Scandurra M, Greiner TC, Chan WC, Vose JM, et al. Diffuse large B-cell lymphoma with concordant bone marrow involvement has peculiar genomic profile and poor clinical outcome. *Hematological oncology* [Internet]. marzo de 2011;29(1):38-41. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20635329>
39. Zarrabi MH, Lysik R, DiStefano J, Zucker S. The anaemia of chronic disorders: studies of iron reutilization in the anaemia of experimental malignancy and chronic inflammation. *British journal of haematology* [Internet]. abril de 1977;35(4):647-58. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/871412>
40. Tisi MC, Bozzoli V, Giachelia M, Massini G, Ricerca BM, Maiolo E, et al. Anemia in diffuse large B-cell non-Hodgkin lymphoma: the role of interleukin-6, hepcidin and erythropoietin. *Leukemia & lymphoma* [Internet]. febrero de 2014;55(2):270-5. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23647063>
41. Troppan KT, Melchardt T, Deutsch A, Schlick K, Stojakovic T, Bullock MD, et al. The significance of pretreatment anemia in the era of R-IPI and NCCN-IPI prognostic risk assessment tools: a dual-center study in diffuse large B-cell lymphoma patients. *European journal of haematology* [Internet]. diciembre de 2015;95(6):538-44. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25677782>

42. Lippi G, Targher G, Montagnana M, Salvagno GL, Zoppini G, Guidi GC. Relation between red blood cell distribution width and inflammatory biomarkers in a large cohort of unselected outpatients. *Archives of pathology & laboratory medicine* [Internet]. abril de 2009;133(4):628-32. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19391664>
43. Förhécz Z, Gombos T, Borgulya G, Pozsonyi Z, Prohászka Z, Jánoskúti L. Red cell distribution width in heart failure: prediction of clinical events and relationship with markers of ineffective erythropoiesis, inflammation, renal function, and nutritional state. *American heart journal* [Internet]. octubre de 2009;158(4):659-66. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19781428>
44. Weiss G, Goodnough LT. Anemia of chronic disease. *The New England journal of medicine* [Internet]. 10 de marzo de 2005;352(10):1011-23. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15758012>
45. Koma Y, Onishi A, Matsuoka H, Oda N, Yokota N, Matsumoto Y, et al. Increased red blood cell distribution width associates with cancer stage and prognosis in patients with lung cancer. *PloS one* [Internet]. 2013;8(11):e80240. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24244659>
46. Lippi G, Filippozzi L, Montagnana M, Salvagno GL, Franchini M, Guidi GC, et al. Clinical usefulness of measuring red blood cell distribution width on admission in patients with acute coronary syndromes. *Clinical chemistry and laboratory medicine* [Internet]. 2009;47(3):353-7. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19676148>
47. Zhou S, Fang F, Chen H, Zhang W, Chen Y, Shi Y, et al. Prognostic significance of the red blood cell distribution width in diffuse large B-cell lymphoma patients. *Oncotarget* [Internet]. 20 de junio de 2017;8(25):40724-31. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28388534>
48. Hossein-nezhad A, Holick MF. Vitamin D for health: a global perspective. *Mayo Clinic proceedings* [Internet]. julio de 2013;88(7):720-55. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23790560>
49. Vaidya R, Witzig TE. Prognostic factors for diffuse large B-cell lymphoma in the R(X)CHOP era. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* [Internet]. noviembre de 2014;25(11):2124-33. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24625454>

50. Lim U, Freedman DM, Hollis BW, Horst RL, Purdue MP, Chatterjee N, et al. A prospective investigation of serum 25-hydroxyvitamin D and risk of lymphoid cancers. *International journal of cancer*. febrero de 2009;124(4):979-86.
51. Drake MT, Maurer MJ, Link BK, Habermann TM, Ansell SM, Micallef IN, et al. Vitamin D insufficiency and prognosis in non-Hodgkin's lymphoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. septiembre de 2010;28(27):4191-8.
52. Bittenbring JT, Neumann F, Altmann B, Achenbach M, Reichrath J, Ziepert M, et al. Vitamin D deficiency impairs rituximab-mediated cellular cytotoxicity and outcome of patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with but not without rituximab. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. octubre de 2014;32(29):3242-8.
53. Pfreundschuh M, Ho AD, Cavallin-Stahl E, Wolf M, Pettengell R, Vasova I, 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. *The Lancet Oncology*. mayo de 2008;9(5):435-44.
54. Kim J, Hong J, Kim SG, Hwang KH, Kim M, Ahn HK, et al. Prognostic Value of Metabolic Tumor Volume Estimated by (18) F-FDG Positron Emission Tomography/Computed Tomography in Patients with Diffuse Large B-Cell Lymphoma of Stage II or III Disease. *Nuclear medicine and molecular imaging [Internet]*. septiembre de 2014;48(3):187-95. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25177375>
55. Sasanelli M, Meignan M, Haioun C, Berriolo-Riedinger A, Casasnovas R-O, Biggi A, et al. Pretherapy metabolic tumour volume is an independent predictor of outcome in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging [Internet]*. noviembre de 2014;41(11):2017-22. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24902639>
56. Chihara D, Oki Y, Onoda H, Taji H, Yamamoto K, Tamaki T, et al. High maximum standard uptake value (SUVmax) on PET scan is associated with shorter survival in patients with diffuse large B cell lymphoma. *International journal of hematology [Internet]*. abril de 2011;93(4):502-8. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21512731>

57. Vitolo U, Trněný M, Belada D, Burke JM, Carella AM, Chua N, et al. Obinutuzumab or Rituximab Plus Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine, and Prednisone in Previously Untreated Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* [Internet]. 1 de noviembre de 2017;35(31):3529-37. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28796588>
58. Lale Kostakoglu, Maurizio Martelli, Laurie H. Sehn, David Belada, Angelo-Michele Carella, Neil Chua, Eva Gonzalez-Barca, Xiaonan Hong, Antonio Pinto, Yuankai Shi, Yoichi Tatsumi, Günter Fingerle-Rowson, Andrea Knapp, Federico Mattiello, Tina Nielsen, Gila UV and MT. Baseline PET-Derived Metabolic Tumor Volume Metrics Predict Progression-Free and Overall Survival in DLBCL after First-Line Treatment: Results from the Phase 3 GOYA Study. *American Society of Hematology*. 2017;130 n.
59. Coiffier B. Diffuse large cell lymphoma. *Current opinion in oncology*. septiembre de 2001;13(5):325-34.
60. 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. *The New England journal of medicine* [Internet]. 20 de junio de 2002;346(25):1937-47. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12075054>
61. Xiao C, Srinivasan L, Calado DP, Patterson HC, Zhang B, Wang J, et al. Lymphoproliferative disease and autoimmunity in mice with increased miR-17-92 expression in lymphocytes. *Nature immunology* [Internet]. abril de 2008;9(4):405-14. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18327259>
62. Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, Gascoyne RD, Delabie J, Ott G, et al. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood* [Internet]. 1 de enero de 2004;103(1):275-82. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14504078>
63. Choi WWL, Weisenburger DD, Greiner TC, Piris MA, Banham AH, Delabie J, et al. A new immunostain algorithm classifies diffuse large B-cell lymphoma into molecular subtypes with high accuracy. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* [Internet]. 1 de septiembre de 2009;15(17):5494-502. Disponible en:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19706817>

64. Battle-López A, González de Villambrosía S, Francisco M, Malatxeberria S, Sáez A, Montalban C, et al. Stratifying diffuse large B-cell lymphoma patients treated with chemoimmunotherapy: GCB/non-GCB by immunohistochemistry is still a robust and feasible marker. *Oncotarget* [Internet]. 5 de abril de 2016;7(14):18036-49. Disponible en:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26910115>
65. Visco C, Li Y, Xu-Monette ZY, Miranda RN, Green TM, Li Y, et al. Comprehensive gene expression profiling and immunohistochemical studies support application of immunophenotypic algorithm for molecular subtype classification in diffuse large B-cell lymphoma: a report from the International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium. *Leukemia* [Internet]. septiembre de 2012;26(9):2103-13. Disponible en:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22437443>
66. Muris JJF, Meijer CJLM, Vos W, van Krieken JHJM, Jiwa NM, Ossenkuppele GJ, et al. Immunohistochemical profiling based on Bcl-2, CD10 and MUM1 expression improves risk stratification in patients with primary nodal diffuse large B cell lymphoma. *The Journal of pathology* [Internet]. abril de 2006;208(5):714-23. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16400625>
67. Nyman H, Jerkeman M, Karjalainen-Lindsberg M-L, Banham AH, Leppä S. Prognostic impact of activated B-cell focused classification in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with R-CHOP. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* [Internet]. agosto de 2009;22(8):1094-101. Disponible en:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19448593>
68. Natkunam Y, Farinha P, Hsi ED, Hans CP, Tibshirani R, Sehn LH, et al. LMO2 protein expression predicts survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with anthracycline-based chemotherapy with and without rituximab. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* [Internet]. 20 de enero de 2008;26(3):447-54. Disponible en:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18086797>
69. Meyer PN, Fu K, Greiner TC, Smith LM, Delabie J, Gascoyne RD, et al. Immunohistochemical methods for predicting cell of origin and survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab. *Journal of*

- clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology [Internet]. 10 de enero de 2011;29(2):200-7. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21135273>
70. Chapuy B, Stewart C, Dunford AJ, Kim J, Kamburov A, Redd RA, et al. Molecular subtypes of diffuse large B cell lymphoma are associated with distinct pathogenic mechanisms and outcomes. *Nature medicine* [Internet]. 2018;24(5):679-90. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29713087>
 71. Pileri SA, Derenzini E, Melle F, Motta G, Calleri A, Antoniotti P, et al. Dissecting diffuse large B-cell lymphomas of the «not otherwise specified» type: the impact of molecular techniques. *F1000Research*. 2018;7.
 72. Ciavarella S, Vegliante MC, Fabbri M, De Summa S, Melle F, Motta G, et al. Dissection of DLBCL microenvironment provides a gene expression-based predictor of survival applicable to formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. diciembre de 2018;29(12):2363-70.
 73. Barrans S, Crouch S, Smith A, Turner K, Owen R, Patmore R, et al. Rearrangement of MYC is associated with poor prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated in the era of rituximab. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* [Internet]. 10 de julio de 2010;28(20):3360-5. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20498406>
 74. Klapper W, Stoecklein H, Zeynalova S, Ott G, Kosari F, Rosenwald A, et al. Structural aberrations affecting the MYC locus indicate a poor prognosis independent of clinical risk factors in diffuse large B-cell lymphomas treated within randomized trials of the German High-Grade Non-Hodgkin's Lymphoma Study Group (DSHNHL). *Leukemia* [Internet]. diciembre de 2008;22(12):2226-9. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18754028>
 75. Lai C, Roschewski M, Melani C, Pittaluga S, Shovlin M, Steinberg SM, et al. MYC gene rearrangement in diffuse large B-cell lymphoma does not confer a worse prognosis following dose-adjusted EPOCH-R. *Leukemia & lymphoma* [Internet]. 2018;59(2):505-8. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28641474>

76. Ennishi D, Jiang A, Boyle M, Collinge B, Grande BM, Ben-Neriah S, et al. Double-Hit Gene Expression Signature Defines a Distinct Subgroup of Germinal Center B-Cell-Like Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* [Internet]. 20 de enero de 2019;37(3):190-201. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30523716>
77. Sha C, Barrans S, Cucco F, Bentley MA, Care MA, Cummin T, et al. Molecular High-Grade B-Cell Lymphoma: Defining a Poor-Risk Group That Requires Different Approaches to Therapy. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* [Internet]. 20 de enero de 2019;37(3):202-12. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30523719>
78. Oki Y, Noorani M, Lin P, Davis RE, Neelapu SS, Ma L, et al. Double hit lymphoma: the MD Anderson Cancer Center clinical experience. *British journal of haematology* [Internet]. septiembre de 2014;166(6):891-901. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24943107>
79. Sesques P, Johnson NA. Approach to the diagnosis and treatment of high-grade B-cell lymphomas with MYC and BCL2 and/or BCL6 rearrangements. *Blood* [Internet]. 2017;129(3):280-8. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27821509>
80. Andreas Rosenwald LHS and DM-B. Prognostic Significance of MYC Single, Double, Triple Hit and MYC-Translocation Partner Status in Diffuse Large B-Cell Lymphoma - a Study By the Lunenburg Lymphoma Biomarker Consortium (LLBC). *Blood*. 2018;132:344.
81. Rosenthal A, Younes A. High grade B-cell lymphoma with rearrangements of MYC and BCL2 and/or BCL6: Double hit and triple hit lymphomas and double expressing lymphoma. *Blood reviews* [Internet]. 2017;31(2):37-42. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27717585>
82. Johnson NA, Slack GW, Savage KJ, Connors JM, Ben-Neriah S, Rogic S, et al. Concurrent expression of MYC and BCL2 in diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* [Internet]. 1 de octubre de 2012;30(28):3452-9. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22851565>

83. Howlett C, Snedecor SJ, Landsburg DJ, Svoboda J, Chong EA, Schuster SJ, et al. Front-line, dose-escalated immunochemotherapy is associated with a significant progression-free survival advantage in patients with double-hit lymphomas: a systematic review and meta-analysis. *British journal of haematology* [Internet]. agosto de 2015;170(4):504-14. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25907897>
84. Green TM, Young KH, Visco C, Xu-Monette ZY, Orazi A, Go RS, et al. Immunohistochemical double-hit score is a strong predictor of outcome in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* [Internet]. 1 de octubre de 2012;30(28):3460-7. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22665537>
85. Hu S, Xu-Monette ZY, Tzankov A, Green T, Wu L, Balasubramanyam A, et al. MYC/BCL2 protein coexpression contributes to the inferior survival of activated B-cell subtype of diffuse large B-cell lymphoma and demonstrates high-risk gene expression signatures: a report from The International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program. *Blood* [Internet]. 16 de mayo de 2013;121(20):4021-31; quiz 4250. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23449635>
86. Staiger AM, Ziepert M, Horn H, Scott DW, Barth TFE, Bernd H-W, et al. Clinical Impact of the Cell-of-Origin Classification and the MYC/ BCL2 Dual Expresser Status in Diffuse Large B-Cell Lymphoma Treated Within Prospective Clinical Trials of the German High-Grade Non-Hodgkin's Lymphoma Study Group. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* [Internet]. 1 de agosto de 2017;35(22):2515-26. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28525305>
87. Perry AM, Alvarado-Bernal Y, Laurini JA, Smith LM, Slack GW, Tan KL, et al. MYC and BCL2 protein expression predicts survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab. *British journal of haematology* [Internet]. mayo de 2014;165(3):382-91. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24506200>
88. Wight JC, Chong G, Grigg AP, Hawkes EA. Prognostication of diffuse large B-cell lymphoma in the molecular era: moving beyond the IPI. *Blood reviews* [Internet]. 2018;32(5):400-15. Disponible en:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29605154>

89. Troppan K, Wenzl K, Deutsch A, Ling H, Neumeister P, Pichler M. MicroRNAs in diffuse large B-cell lymphoma: implications for pathogenesis, diagnosis, prognosis and therapy. *Anticancer research* [Internet]. febrero de 2014;34(2):557-64. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24510984>
90. Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [Internet]. 2 de marzo de 2004;101(9):2999-3004. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14973191>
91. Calin GA, Liu C-G, Sevignani C, Ferracin M, Felli N, Dumitru CD, et al. MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [Internet]. 10 de agosto de 2004;101(32):11755-60. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15284443>
92. Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nature reviews Cancer* [Internet]. noviembre de 2006;6(11):857-66. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17060945>
93. Pichler M, Winter E, Ressa AL, Bauernhofer T, Gerger A, Kiesslich T, et al. miR-181a is associated with poor clinical outcome in patients with colorectal cancer treated with EGFR inhibitor. *Journal of clinical pathology* [Internet]. marzo de 2014;67(3):198-203. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24098024>
94. Al-Ali BM, Ressa AL, Gerger A, Pichler M. MicroRNAs in renal cell carcinoma: implications for pathogenesis, diagnosis, prognosis and therapy. *Anticancer research* [Internet]. septiembre de 2012;32(9):3727-32. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22993312>
95. Garzon R, Marcucci G, Croce CM. Targeting microRNAs in cancer: rationale, strategies and challenges. *Nature reviews Drug discovery* [Internet]. octubre de 2010;9(10):775-89. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20885409>
96. Chen C-Z, Li L, Lodish HF, Bartel DP. MicroRNAs modulate hematopoietic

- lineage differentiation. *Science (New York, NY)* [Internet]. 2 de enero de 2004;303(5654):83-6. Disponible en:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14657504>
97. Di Lisio L, Sánchez-Beato M, Gómez-López G, Rodríguez ME, Montes-Moreno S, Mollejo M, et al. MicroRNA signatures in B-cell lymphomas. *Blood cancer journal* [Internet]. febrero de 2012;2(2):e57. Disponible en:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22829247>
 98. Lawrie CH. MicroRNAs and lymphomagenesis: a functional review. *British journal of haematology* [Internet]. marzo de 2013;160(5):571-81. Disponible en:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23205669>
 99. Mazan-Mamczarz K, Gartenhaus RB. Role of microRNA deregulation in the pathogenesis of diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL). *Leukemia research* [Internet]. noviembre de 2013;37(11):1420-8. Disponible en:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24054860>
 100. Garzon R, Marcucci G. Potential of microRNAs for cancer diagnostics, prognostication and therapy. *Current opinion in oncology* [Internet]. noviembre de 2012;24(6):655-9. Disponible en:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23079782>
 101. Kim S-W, Ramasamy K, Bouamar H, Lin A-P, Jiang D, Aguiar RCT. MicroRNAs miR-125a and miR-125b constitutively activate the NF- κ B pathway by targeting the tumor necrosis factor alpha-induced protein 3 (TNFAIP3, A20). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [Internet]. 15 de mayo de 2012;109(20):7865-70. Disponible en:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22550173>
 102. Ventura A, Young AG, Winslow MM, Lintault L, Meissner A, Erkland SJ, et al. Targeted deletion reveals essential and overlapping functions of the miR-17 through 92 family of miRNA clusters. *Cell* [Internet]. 7 de marzo de 2008;132(5):875-86. Disponible en:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18329372>
 103. Eis PS, Tam W, Sun L, Chadburn A, Li Z, Gomez MF, et al. Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [Internet]. 8 de marzo de 2005;102(10):3627-32. Disponible en:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15738415>

104. He X, He L, Hannon GJ. The guardian's little helper: microRNAs in the p53 tumor suppressor network. *Cancer research* [Internet]. 1 de diciembre de 2007;67(23):11099-101. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18056431>
105. Craig VJ, Cogliatti SB, Imig J, Renner C, Neuenschwander S, Rehrauer H, et al. Myc-mediated repression of microRNA-34a promotes high-grade transformation of B-cell lymphoma by dysregulation of FoxP1. *Blood* [Internet]. 9 de junio de 2011;117(23):6227-36. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21460242>
106. Tilly H, Gomes da Silva M, Vitolo U, Jack A, Meignan M, Lopez-Guillermo A, et al. Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* [Internet]. septiembre de 2015;26 Suppl 5:v116-25. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26314773>
107. Lawrie CH, Chi J, Taylor S, Tramonti D, Ballabio E, Palazzo S, et al. Expression of microRNAs in diffuse large B cell lymphoma is associated with immunophenotype, survival and transformation from follicular lymphoma. *Journal of cellular and molecular medicine* [Internet]. julio de 2009;13(7):1248-60. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19413891>
108. 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* [Internet]. 3 de febrero de 2000;403(6769):503-11. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10676951>
109. Culpin RE, Proctor SJ, Angus B, Crosier S, Anderson JJ, Mainou-Fowler T. A 9 series microRNA signature differentiates between germinal centre and activated B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma cell lines. *International journal of oncology* [Internet]. agosto de 2010;37(2):367-76. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20596664>
110. Lawrie CH, Soneji S, Marafioti T, Cooper CDO, Palazzo S, Paterson JC, et al. MicroRNA expression distinguishes between germinal center B cell-like and activated B cell-like subtypes of diffuse large B cell lymphoma. *International*

- journal of cancer [Internet]. 1 de septiembre de 2007;121(5):1156-61. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17487835>
111. Culpin RE, Sieniawski M, Proctor SJ, Menon G, Mainou-Fowler T. MicroRNAs are suitable for assessment as biomarkers from formalin-fixed paraffin-embedded tissue, and miR-24 represents an appropriate reference microRNA for diffuse large B-cell lymphoma studies. *Journal of clinical pathology* [Internet]. marzo de 2013;66(3):249-52. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23172553>
 112. Alencar AJ, Malumbres R, Kozloski GA, Advani R, Talreja N, Chinichian S, et al. MicroRNAs are independent predictors of outcome in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with R-CHOP. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* [Internet]. 15 de junio de 2011;17(12):4125-35. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21525173>
 113. Montes-Moreno S, Martinez N, Sanchez-Espiridión B, Díaz Uriarte R, Rodriguez ME, Saez A, et al. miRNA expression in diffuse large B-cell lymphoma treated with chemoimmunotherapy. *Blood* [Internet]. 28 de julio de 2011;118(4):1034-40. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21633089>
 114. Wedge E, Hansen JW, Garde C, Asmar F, Tholstrup D, Kristensen SS, et al. Global hypomethylation is an independent prognostic factor in diffuse large B cell lymphoma. *American journal of hematology* [Internet]. julio de 2017;92(7):689-94. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28378885>
 115. Jones PA. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nature reviews Genetics* [Internet]. 29 de mayo de 2012;13(7):484-92. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22641018>
 116. Raynal NJ-M, Si J, Taby RF, Gharibyan V, Ahmed S, Jelinek J, et al. DNA methylation does not stably lock gene expression but instead serves as a molecular mark for gene silencing memory. *Cancer research*. marzo de 2012;72(5):1170-81.
 117. Morin RD, Mendez-Lago M, Mungall AJ, Goya R, Mungall KL, Corbett RD, et al. Frequent mutation of histone-modifying genes in non-Hodgkin lymphoma. *Nature*. julio de 2011;476(7360):298-303.

118. Pasqualucci L, Trifonov V, Fabbri G, Ma J, Rossi D, Chiarenza A, et al. Analysis of the coding genome of diffuse large B-cell lymphoma. *Nature genetics*. julio de 2011;43(9):830-7.
119. Aapro MS, Bohlius J, Cameron DA, Dal Lago L, Donnelly JP, Kearney N, et al. 2010 update of EORTC guidelines for the use of granulocyte-colony stimulating factor to reduce the incidence of chemotherapy-induced febrile neutropenia in adult patients with lymphoproliferative disorders and solid tumours. *Eur J Cancer* [Internet]. 2010/11/26. 2011;47(1):8-32. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21095116>
120. Smith TJ, Khatcheressian J, Lyman GH, Ozer H, Armitage JO, Balducci L, et al. 2006 update of recommendations for the use of white blood cell growth factors: an evidence-based clinical practice guideline. *J Clin Oncol* [Internet]. 2006/05/10. 2006;24(19):3187-205. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16682719>
121. Green JA, Dawson AA, Fell LF, Murray S. Measurement of drug dosage intensity in MVPP therapy in Hodgkin's disease. *Br J Clin Pharmacol* [Internet]. 1980/05/01. 1980;9(5):511-4. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6893156>
122. Hryniuk W, Bush H. The importance of dose intensity in chemotherapy of metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* [Internet]. 1984/11/01. 1984;2(11):1281-8. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6387060>
123. Kwak LW, Halpern J, Olshen RA, Horning SJ. Prognostic significance of actual dose intensity in diffuse large-cell lymphoma: results of a tree-structured survival analysis. *J Clin Oncol* [Internet]. 1990/06/01. 1990;8(6):963-77. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2348230>
124. Yamaguchi H, Hirakawa T, Inokuchi K. Importance of relative dose intensity in chemotherapy for diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Exp Hematop* [Internet]. 2011/06/02. 2011;51(1):1-5. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21628854>
125. Lyman GH, Dale DC, Friedberg J, Crawford J, Fisher RI. Incidence and predictors of low chemotherapy dose-intensity in aggressive non-Hodgkin's lymphoma: a nationwide study. *J Clin Oncol* [Internet]. 2004/09/24. 2004;22(21):4302-11. Disponible en:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15381684>

126. Zelenetz AD. Risk models for chemotherapy-induced neutropenia in non-Hodgkin's lymphoma. *Oncology (Williston Park)* [Internet]. 2003/12/20. 2003;17(11 Suppl 11):21-6. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14682115>
127. Intragumtornchai T, Sutheesophon J, Sutcharitchan P, Swasdikul D. A predictive model for life-threatening neutropenia and febrile neutropenia after the first course of CHOP chemotherapy in patients with aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Leuk Lymphoma* [Internet]. 2000/04/07. 2000;37(3-4):351-60. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10752986>
128. Doorduijn JK, van der Holt B, van Imhoff GW, van der Hem KG, Kramer MH, van Oers MH, et al. CHOP compared with CHOP plus granulocyte colony-stimulating factor in elderly patients with aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* [Internet]. 2003/08/14. 2003;21(16):3041-50. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12915593>
129. Robert J, Hoerni B. Age dependence of the early-phase pharmacokinetics of doxorubicin. *Cancer Res* [Internet]. 1983/09/01. 1983;43(9):4467-9. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6871877>
130. Hershman DL, McBride RB, Eisenberger A, Tsai WY, Grann VR, Jacobson JS. Doxorubicin, cardiac risk factors, and cardiac toxicity in elderly patients with diffuse B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* [Internet]. 2008/07/02. 2008;26(19):3159-65. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18591554>
131. Luminari S, Montanini A, Caballero D, Bologna S, Notter M, Dyer MJ, et al. Nonpegylated liposomal doxorubicin (MyocetTM) combination (R-COMP) chemotherapy in elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL): results from the phase II EUR018 trial. *Ann Oncol* [Internet]. 2009/12/17. 2010;21(7):1492-9. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20007997>
132. El-Galaly TC, Villa D, Alzahrani M, Hansen JW, Sehn LH, Wilson D, et al. Outcome prediction by extranodal involvement, IPI, R-IPI, and NCCN-IPI in the PET/CT and rituximab era: A Danish-Canadian study of 443 patients with diffuse-large B-cell lymphoma. *American journal of hematology* [Internet].

- noviembre de 2015;90(11):1041-6. Disponible en:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26260224>
133. Seo S, Hong JY, Yoon S, Yoo C, Park JH, Lee JB, et al. Prognostic significance of serum beta-2 microglobulin in patients with diffuse large B-cell lymphoma in the rituximab era. *Oncotarget*. noviembre de 2016;7(47):76934-43.
 134. Vincent C, Chanard J, Caudwell V, Lavaud S, Wong T, Revillard JP. Kinetics of 125I-beta 2-microglobulin turnover in dialyzed patients. *Kidney international*. diciembre de 1992;42(6):1434-43.
 135. Hong J, Kim SJ, Chang MH, Kim J-A, Kwak J-Y, Kim JS, et al. Improved prognostic stratification using NCCN- and GELTAMO-international prognostic index in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Oncotarget* [Internet]. 3 de noviembre de 2017;8(54):92171-82. Disponible en:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29190906>
 136. Legouffe E, Rodriguez C, Picot MC, Richard B, Klein B, Rossi JF, et al. C-reactive protein serum level is a valuable and simple prognostic marker in non Hodgkin's lymphoma. *Leukemia & lymphoma*. octubre de 1998;31(3-4):351-7.
 137. Seymour JF, Talpaz M, Cabanillas F, Wetzler M, Kurzrock R. Serum interleukin-6 levels correlate with prognosis in diffuse large-cell lymphoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. marzo de 1995;13(3):575-82.
 138. Preti HA, Cabanillas F, Talpaz M, Tucker SL, Seymour JF, Kurzrock R. Prognostic value of serum interleukin-6 in diffuse large-cell lymphoma. *Annals of internal medicine*. agosto de 1997;127(3):186-94.
 139. Niitsu N, Okamoto M, Nakamine H, Yoshino T, Tamaru J, Nakamura S, et al. Simultaneous elevation of the serum concentrations of vascular endothelial growth factor and interleukin-6 as independent predictors of prognosis in aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *European journal of haematology*. febrero de 2002;68(2):91-100.
 140. Pfreundschuh M, Ho AD, Cavallin-Stahl E, Wolf M, Pettengell R, Vasova I, 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. *The Lancet Oncology* [Internet]. mayo de

2008;9(5):435-44. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18400558>

141. Kim DH, Baek JH, Chae YS, Kim Y-K, Kim HJ, Park YH, et al. Absolute lymphocyte counts predicts response to chemotherapy and survival in diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia*. octubre de 2007;21(10):2227-30.
142. Oki Y, Georgakis G V, Migone T-S, Kwak LW, Younes A. Elevated serum BLyS levels in patients with non-Hodgkin lymphoma. *Leukemia & lymphoma*. septiembre de 2007;48(9):1869-71.
143. Shivakumar L, Ansell S. Targeting B-lymphocyte stimulator/B-cell activating factor and a proliferation-inducing ligand in hematologic malignancies. *Clinical lymphoma & myeloma*. septiembre de 2006;7(2):106-8.
144. Dirx AEM, Oude Egbrink MGA, Wagstaff J, Griffioen AW. Monocyte/macrophage infiltration in tumors: modulators of angiogenesis. *Journal of leukocyte biology*. diciembre de 2006;80(6):1183-96.
145. Li Z-M, Huang J-J, Xia Y, Sun J, Huang Y, Wang Y, et al. Blood lymphocyte-to-monocyte ratio identifies high-risk patients in diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *PloS one* [Internet]. 2012;7(7):e41658. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22911837>
146. Yamauchi T, Tasaki T, Tai K, Ikegaya S, Takagi K, Negoro E, et al. Prognostic effect of peripheral blood cell counts in advanced diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP-like chemotherapy: A single institution analysis. *Oncology letters* [Internet]. febrero de 2015;9(2):851-6. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25621059>
147. Mbeunkui F, Johann DJ. Cancer and the tumor microenvironment: a review of an essential relationship. *Cancer chemotherapy and pharmacology* [Internet]. marzo de 2009;63(4):571-82. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19083000>
148. Marcucci G, Maharry KS, Metzeler KH, Volinia S, Wu Y-Z, Mrózek K, et al. Clinical role of microRNAs in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: miR-155 upregulation independently identifies high-risk patients. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* [Internet]. 10 de junio de 2013;31(17):2086-93. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23650424>

149. Schwind S, Maharry K, Radmacher MD, Mrózek K, Holland KB, Margeson D, et al. Prognostic significance of expression of a single microRNA, miR-181a, in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* [Internet]. 20 de diciembre de 2010;28(36):5257-64. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21079133>
150. Yanaihara N, Caplen N, Bowman E, Seike M, Kumamoto K, Yi M, et al. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer cell*. marzo de 2006;9(3):189-98.
151. Rosenfeld N, Aharonov R, Meiri E, Rosenwald S, Spector Y, Zepeniuk M, et al. MicroRNAs accurately identify cancer tissue origin. *Nature biotechnology*. abril de 2008;26(4):462-9.
152. Malumbres R, Sarosiek KA, Cubedo E, Ruiz JW, Jiang X, Gascoyne RD, et al. Differentiation stage-specific expression of microRNAs in B lymphocytes and diffuse large B-cell lymphomas. *Blood*. abril de 2009;113(16):3754-64.
153. Berglund M, Hedström G, Amini R-M, Enblad G, Thunberg U. High expression of microRNA-200c predicts poor clinical outcome in diffuse large B-cell lymphoma. *Oncology reports*. febrero de 2013;29(2):720-4.
154. Wu PY, Zhang XD, Zhu J, Guo XY, Wang JF. Low expression of microRNA-146b-5p and microRNA-320d predicts poor outcome of large B-cell lymphoma treated with cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone. *Human pathology*. agosto de 2014;45(8):1664-73.
155. Chen W, Wang H, Chen H, Liu S, Lu H, Kong D, et al. Clinical significance and detection of microRNA-21 in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma in Chinese population. *European journal of haematology*. 2014;92(5):407-12.
156. He M, Gao L, Zhang S, Tao L, Wang J, Yang J, et al. Prognostic significance of miR-34a and its target proteins of FOXP1, p53, and BCL2 in gastric MALT lymphoma and DLBCL. *Gastric cancer : official journal of the International Gastric Cancer Association and the Japanese Gastric Cancer Association*. 2014;17(3):431-41.
157. Go H, Jang J-Y, Kim P-J, Kim Y-G, Nam SJ, Paik JH, et al. MicroRNA-21 plays an oncogenic role by targeting FOXO1 and activating the PI3K/AKT pathway in

- diffuse large B-cell lymphoma. *Oncotarget*. junio de 2015;6(17):15035-49.
158. Li J, Fu R, Yang L, Tu W. miR-21 expression predicts prognosis in diffuse large B-cell lymphoma. *International journal of clinical and experimental pathology*. 2015;8(11):15019-24.
159. Troppan K, Wenzl K, Pichler M, Pursche B, Schwarzenbacher D, Feichtinger J, et al. miR-199a and miR-497 Are Associated with Better Overall Survival due to Increased Chemosensitivity in Diffuse Large B-Cell Lymphoma Patients. *International journal of molecular sciences*. agosto de 2015;16(8):18077-95.
160. Huang Y, Zou Y, Lin L, Ma X, Zheng R. miR-101 regulates the cell proliferation and apoptosis in diffuse large B-cell lymphoma by targeting MEK1 via regulation of the ERK/MAPK signaling pathway. *Oncology reports*. enero de 2019;41(1):377-86.
161. J.I. H, K. H, S. B, S. H, D. L, M. S, et al. In-depth miRNA profiling of germinal center derived B-cell lymphomas by next generation sequencing: A report from the German IcgC-Mmml-Seq project. *Blood* [Internet]. 2013;122(21):2500. Disponible en:
<http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L71266098%0Ahttp://bloodjournal.hematologylibrary.org/content/122/21/2500.abstract?sid=79f27a8b-ac74-47dd-a3b7-e1bdab5494e5> LK -
<http://sfx.aub.aau.dk/sfxaub?sid=EMBASE&issn=00064971&>
162. Xiong L, Jiang W, Zhou R, Mao C, Guo Z. Identification and analysis of the regulatory network of Myc and microRNAs from high-throughput experimental data. *Computers in biology and medicine* [Internet]. septiembre de 2013;43(9):1252-60. Disponible en:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23930820>
163. Ottman R, Nguyen C, Lorch R, Chakrabarti R. MicroRNA expressions associated with progression of prostate cancer cells to antiandrogen therapy resistance. *Molecular cancer* [Internet]. 3 de enero de 2014;13:1. Disponible en:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24387052>
164. Lenarduzzi M, Hui ABY, Alajez NM, Shi W, Williams J, Yue S, et al. MicroRNA-193b enhances tumor progression via down regulation of neurofibromin 1. *PloS one* [Internet]. 2013;8(1):e53765. Disponible en:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23335975>

165. Khordadmehr M, Shahbazi R, Sadreddini S, Baradaran B. miR-193: A new weapon against cancer. *Journal of cellular physiology*. agosto de 2019;234(10):16861-72.
166. Unno K, Zhou Y, Zimmerman T, Plataniias LC, Wickrema A. Identification of a novel microRNA cluster miR-193b-365 in multiple myeloma. *Leukemia & lymphoma* [Internet]. noviembre de 2009;50(11):1865-71. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19883314>
167. Li Y, Gao L, Luo X, Wang L, Gao X, Wang W, et al. Epigenetic silencing of microRNA-193a contributes to leukemogenesis in t(8;21) acute myeloid leukemia by activating the PTEN/PI3K signal pathway. *Blood*. enero de 2013;121(3):499-509.
168. Gao X, Lin J, Gao L, Li Y, Wang L, Yu L. MicroRNA-193b regulates c-Kit proto-oncogene and represses cell proliferation in acute myeloid leukemia. *Leukemia research*. septiembre de 2011;35(9):1226-32.
169. Mizuguchi Y, Takizawa T, Uchida E. Host cellular microRNA involvement in the control of hepatitis B virus gene expression and replication. *World journal of hepatology* [Internet]. 8 de abril de 2015;7(4):696-702. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25866606>
170. Kohno T, Tsuge M, Murakami E, Hiraga N, Abe H, Miki D, et al. Human microRNA hsa-miR-1231 suppresses hepatitis B virus replication by targeting core mRNA. *Journal of viral hepatitis* [Internet]. 2014;21(9):e89-97. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24835118>
171. Zheng J, Huang X, Tan W, Yu D, Du Z, Chang J, et al. Pancreatic cancer risk variant in LINC00673 creates a miR-1231 binding site and interferes with PTPN11 degradation. *Nature genetics* [Internet]. 2016;48(7):747-57. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27213290>
172. Zhang J, Zhang J, Qiu W, Zhang J, Li Y, Kong E, et al. MicroRNA-1231 exerts a tumor suppressor role through regulating the EGFR/PI3K/AKT axis in glioma. *Journal of neuro-oncology*. septiembre de 2018;139(3):547-62.

Anexos

RESEARCH ARTICLE

Differential Impact of Relative Dose-Intensity Reductions in Diffuse Large B-Cell Lymphoma Treated with R-CHOP21 or R-CHOP14

Antonio Gutiérrez^{1*}, Leyre Bento¹, Antonia Maria Bautista-Gili¹, Francesc Garcia², Jordi Martínez-Serra¹, Blanca Sanchez², Clara Martorell³, Jordi Gines³, Lucia Garcia¹, Eva Gimeno², Mariana Ferraro¹, Raquel Del Campo⁴, Joan Bargay⁴, Albert Perez¹, Javier Vercher⁵, Miguel Scaff⁶, Ana Pacheco⁷, Carmen Ballester¹, Florencia Garcia⁸, Rafael Ramos⁹, Antonio Salar², Joan Besalduch¹

1 Hematology Department, Son Espases University Hospital, Palma, Spain, **2** Hematology Department, Hospital del Mar, Barcelona, Spain, **3** Pharmacy Department, Son Espases University Hospital, Palma, Spain, **4** Hematology Department, Son Llatzer Hospital, Palma, Spain, **5** Hematology Department, Can Misses Hospital, Ibiza, Spain, **6** Hematology Department, Hospital of Manacor, Manacor, Spain, **7** Hematology Department, Mateu Orfila Hospital, Mahon, Spain, **8** Oncology Department, University Hospital Son Espases, Palma, Spain, **9** Pathology Department, University Hospital Son Espases, Palma, Spain

✉ These authors contributed equally to this work.

* antonio.gutierrez@ssib.es


 OPEN ACCESS

Citation: Gutiérrez A, Bento L, Bautista-Gili AM, Garcia F, Martínez-Serra J, Sanchez B, et al. (2015) Differential Impact of Relative Dose-Intensity Reductions in Diffuse Large B-Cell Lymphoma Treated with R-CHOP21 or R-CHOP14. PLoS ONE 10(4): e0123978. doi:10.1371/journal.pone.0123978

Academic Editor: Andreas-Claudius Hoffmann, West German Cancer Center, GERMANY

Received: October 26, 2014

Accepted: February 24, 2015

Published: April 24, 2015

Copyright: © 2015 Gutiérrez et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper.

Funding: The authors have no support or funding to report.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abstract

DLBCL is an aggressive lymphoma treated with R-CHOP. Recently, attempts have been made to improve the outcome by increasing both dose-density and intensity but there have been no benefits in terms of survival. When treating malignancies RDI is important to consider but there is little published information on DLBCL. The purpose of this study was to analyze the differential prognostic impact of RDI in two cohorts of DLBCL patients treated with R-CHOP21 or R-CHOP14. From January 2001 to August 2013 we included DLBCL patients homogeneously treated with R-CHOP21 or R-CHOP14, with or without radiotherapy, at University Hospital Son Espases, Hospital Son Llatzer of Palma and Hospital del Mar of Barcelona (N = 157). In order to avoid selection bias the patients were retrospectively identified from the Pathology Department and Pharmacy registries. Median follow-up was 68 months. There was no difference in the response or survival between the two cohorts. In the R-CHOP21 group, both a reduction higher than 15% in RDI (RR 7.41) and R-IPi (RR 2.99) were independently associated with OS. However, a reduction higher than 15% in RDI (RR 4.41) was only noted for PFS. In the R-CHOP14 group, NCCN-IPi (RR 7.09) and B-symptoms (RR 5.37) for OS; AA stage III-IV (RR 6.26) and bulky disease (RR 4.05) for PFS. There was a trend towards a higher rate of RDI reduction observed in the R-CHOP14 group but it only made an impact in the R-CHOP21 group. We conclude that R-CHOP21 and R-CHOP14 are equivalent regimens in terms of response and survival, but only if RDI reductions are avoided. For patients receiving R-CHOP21 we recommend using clinical and support measures in order to avoid RDI reductions.

Introduction

DLBCL is the most common non Hodgkin lymphoma. It is an aggressive but potentially curable lymphoma [1]. Before the chemo-immunotherapy era, combination chemotherapy with cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine and prednisone (CHOP) administered every 21 days was the established standard treatment.

More recently attempts have been made to improve the outcome by both increasing dose-density (DD) (CHOP14) or intensity (second and third generation regimens, CHOEP, ACVBP, frontline high dose therapy followed by autologous stem cell transplantation)[2, 3]. Only CHOP14 first and, more importantly, the addition of rituximab, has improved survival in comparison to standard CHOP [4–6].

Even though phase 2 studies had predicted promising results after adding rituximab to the regimen, when randomised phase 3 trials were carried out there were no shown benefits due to their higher toxicity when compared with R-CHOP[7, 8]. This has meant that R-CHOP administered every 21 days (R-CHOP21) has become the standard treatment for DLBCL patients.

Prognostic factors in DLBCL may be related to the patient (e.g. age and performance status), to the tumor itself and the aggressiveness of its markers (e.g. stage, tumor burden, proliferation index, LDH or beta-2-microglobulin) and to the therapeutic strategy (e.g. therapeutic regimen or relative dose intensity (RDI)). In routine clinical practice patient and tumor-related prognostic factors summarized in prognostic models such as the International Prognostic Index (IPI) and age-adjusted IPI (a-IPI) are considered[9]. A revised version was reported in the post-rituximab era[10] and a new enhanced version called NCCN-IPI, demonstrating a better discrimination for risk groups, has been recently reported[11].

However, treatment-related factors such as RDI are not always routinely considered. RDI represents the ratio of the amount of a drug actually administered to the amount planned for a fixed time period and is an important issue to consider when treating malignancies[12, 13]. The purpose of calculating RDI is to evaluate whether or not the planned dose intensity of a chemotherapy treatment was actually achieved. Although it is a well-known prognostic factor in Hodgkin lymphoma [14, 15], limited information has been published on DLBCL [16–18]. The purpose of this study is to further analyze the prognostic impact of RDI in two cohorts of DLBCL patients treated with R-CHOP21 or R-CHOP14 to evaluate its differential impact when increasing dose density.

Methods

Patients

All patients diagnosed with DLBCL from January 2001 to August 2013 at University Hospital Son Espases were retrospectively identified by the Pathology Department registry to avoid selection bias. Only patients treated with R-CHOP21 or R-CHOP14 +/- radiotherapy were included. We also added all the patients treated with R-CHOP14 during the same time period in two additional hospitals (Hospital Son Llatzer of Palma and Hospital del Mar of Barcelona) identified by their Pathology and Pharmacy registries to avoid selection bias.

Patients receiving other chemotherapy regimens or consolidations, with severe concomitant medical or psychiatric illnesses, central nervous system involvement or a bilirubin level >1.5 mg/dl, a cardiac ejection fraction of <50% and a pulmonary function test and diffusing lung capacity of <50% of the predictive value, were excluded. Double hit DLBCL were also excluded. The retrospective study was approved by the local ethics committee: Comitè ètic de d'Investigació clínica de les Illes Balears (CEIB-IB) with the number IB 1680/11 PI. Written inform

consent were obtained from living patients. For those without written consent, patient records and information was anonymized and de-identified prior to analysis.

At diagnosis the main prognostic factors in DLBCL were obtained, including international prognostic index (IPI) factors[9] and NCCN-IPI[11]. Evaluations were carried out following standard guidelines[19].

RDI calculation and statistical analysis

RDI represents the ratio of the amount of a drug actually administered to the amount planned for a fixed time period. RDI was calculated as previously described. Briefly, the RDI of each drug was obtained followed by an average of RDI in CHOP consisting in the sum of RDI of the 3 drugs divided by 3[12, 20].

Overall survival (OS) and progression-free survival (PFS) were measured from the date of diagnosis and were estimated according to the Kaplan-Meier method[21]. Comparisons among those variables of interest were performed by the log-rank test[22]. Multivariate analysis with the variables that proved to be significant in univariate analysis was performed according to the Cox proportional hazard regression model[23]. All p-values reported were two-sided and statistical significance was defined at $p < 0.05$.

Results

Patient selection and clinical characteristics

A total of 188 patients were diagnosed and treated at Son Espases University Hospital in the time period selected from Pathology Department records. Seventy three patients were excluded for the following reasons: not receiving rituximab ($n = 29$), receiving additional consolidation therapy such as autologous stem cell transplantation or rituximab maintenance ($n = 25$), other regimens with higher or lower intensity ($n = 9$), move to another center ($n = 6$), diagnosis at autopsy ($n = 2$) and other reasons ($n = 2$). We included 115 patients (74 in the R-CHOP21 and 41 in the R-CHOP14 cohort) from Son Espases Hospital. We made the same process and selection in both Son Llatzer Hospital and Hospital del Mar, and included 24 and 18 patients, respectively, for a final total of 83 patients in the R-CHOP14 cohort. Table 1 shows that both cohorts were similar in the majority of clinical characteristics ($n = 157$), with the R-CHOP14 cohort being younger.

Treatment and dose intensity reductions

Median number of cycles of R-CHOP received was 6 in both groups (range 1–8). Patients in the R-CHOP14 cohort received primary G-CSF prophylaxis, whereas in the R-CHOP21 41% of patients received secondary G-CSF prophylaxis. We reserved primary prophylaxis for the 28% of the patients with more than a 20% risk of febrile neutropenia following standard guidelines for G-CSF use [24, 25]. Thirty percent of the patients in the R-CHOP21 group needed no G-CSF support. In both groups, 36% and 32% of patients were consolidated with radiotherapy, respectively for R-CHOP21 and R-CHOP14 ($p = 0.62$).

In spite of the above presented differential G-CSF prophylaxis policy, median reduction in RDI showed a tendency to be higher in the R-CHOP14 cohort: 9.2% versus 5.8% for R-CHOP21 ($p = 0.094$). However, the percentage of patients with a reduction in RDI greater than 15% between the two cohorts was similar (34% and 31% for R-CHOP14 and R-CHOP21 groups, respectively; $p = 0.74$). The causes for a higher than 15% reduction in the R-CHOP14 cohort ($n = 28$) were: infectious complications in 14 patients (48%), hematological toxicity in 6 (21%), age and comorbidities in 2 (7%), neurotoxicity in 2 (7%), poor compliance or logistic

Table 1. Main clinical characteristics of the patients.

	R-CHOP21 group (n = 74)	R-CHOP14 group (n = 83)	P
Age (median & range)	65 (25–88)	55 (15–79)	0.001
Sex (M/F)	34 (46%) / 40 (54%)	51 (61%) / 32 (39%)	0.056
ECOG PS > 1	17 (23%)	18 (22%)	0.85
Ann Arbor stage III-IV	40 (54%)	48 (58%)	0.75
B-symptoms	25 (34%)	26 (31%)	0.86
Elevated LDH	33 (46%)	40 (49%)	0.75
> 1 extranodal site	8 (11%)	19 (23%)	0.057
Bulky disease	23 (31%)	34 (41%)	0.24
a-IPI > 1	31 (42%)	31 (38%)	0.63
R-IPI unfavorable	24 (32%)	26 (32%)	1
NCCN-IPI:			0.31
- Low	9 (13%)	17 (21%)	
- Low-intermediate	27 (39%)	35 (44%)	
- High-intermediate	26 (38%)	24 (30%)	
- High	7 (10%)	4 (5%)	
Elevated Beta-2-microglobulin	32 (49%)	31 (39%)	0.24
Radiotherapy	27 (36%)	27 (32%)	0.62

R-CHOP: rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, prednisone; M: male, F: female; ECOG PS: Eastern Cooperative Oncology Group performance status; LDH: lactate dehydrogenase; a-IPI: age-adjusted International Prognosis Index. R-IPI: revised International Prognosis Index; NCCN-IPI: enhanced international prognostic index.

doi:10.1371/journal.pone.0123978.t001

problems in 2 (7%) and other non-related causes in 2 (7%). The causes for a higher than 15% reduction in the R-CHOP21 cohort (n = 23) were: age and comorbidities in 12 (52%), hematological toxicity in 4 (17%), infectious complications in 2 (9%), mucositis in 2 (9%), poor compliance in 1 (4%) and other non-related causes in 2 (9%).

Outcome and survival analysis between treatment groups

Overall response and complete response rates were similar in both groups: 86% and 76% for R-CHOP21 and 94% and 74% for R-CHOP14 (p = 0.17 and p = 0.85, respectively). However, when we considered only patients with higher than 15% reduction in RDI (n = 49), a significant reduction in CR rate was observed in the R-CHOP21 compared to the R-CHOP14 cohort (52% versus 82%, respectively; p = 0.033).

The median follow-up for living patients was 68 months (4–156). Tables 2–4 show the univariate and multivariate analysis of prognostic factors influencing OS and PFS.

When considering the global group (Table 2), there were no differences between the two cohorts in terms of either OS or PFS (Fig 1). A reduction higher than 15% in RDI was the only factor independently associated with both a worse OS (RR 2.63) and PFS (RR 2.42). Older age (RR 3.19) and ECOG PS>1 (RR 2.25) also independently influenced OS, and an unfavorable R-IPI was also associated with a worse PFS (RR 2.62).

In R-CHOP21 (Table 4), both a reduction higher than 15% in RDI (RR 7.41) and an unfavorable R-IPI (RR 2.99) were independently associated with a worse OS. For PFS only a reduction higher than 15% in RDI (RR 4.41) was independently associated with worse PFS (Fig 2).

Table 2. Prognostic factors influencing OS and PFS in the global group.

	5y-OS	P	5y-PFS	P
Age:		0.001		0.047
- 0-60	86% (78-94)		80% (72-89)	
- >60	65% (54-77)		67% (55-79)	
Sex:		0.58		0.9
- Male	78% (69-88)		75% (65-85)	
- Female	73% (62-84)		72% (61-84)	
ECOG PS:		0.001		0.1
- 0-1	80% (73-88)		77% (69-85)	
- 2-4	60% (44-76)		63% (45-81)	
Ann Arbor stage:		0.33		0.008
- I-II	79% (69-89)		86% (78-94)	
- III-IV	74% (64-84)		64% (53-85)	
B-symptoms:		0.008		0.008
- No	83% (75-90)		81% (73-89)	
- Yes	62% (48-76)		57% (42-73)	
LDH:		0.15		0.057
- Normal	84% (75-92)		80% (70-90)	
- Elevated	67% (56-78)		67% (56-79)	
Extranodal sites:		0.47		0.47
- 0-1	78% (65-92)		75% (67-83)	
- > 1	65% (48-83)		71% (53-89)	
Bulky disease:		0.87		0.18
- No	77% (68-85)		76% (67-85)	
- Yes	75% (63-86)		70% (58-83)	
Beta-2-microglobulin:		0.012		0.2
- Normal	85% (77-93)		80% (71-89)	
- Elevated	70% (58-82)		71% (59-84)	
R-IPI:		0.011		0.001
- Low-int	83% (76-91)		83% (75-90)	
- High	60% (48-74)		56% (40-71)	
NCCN-IPI:		<0.001		0.010
- Low-int	78% (71-85)		75% (67-82)	
- High	34% (5-63)		48% (11-85)	
Radiotherapy:		0.21		0.25
- Yes	82% (71-93)		80% (69-91)	
- No	73% (64-82)		70% (61-80)	
RDI reduction:		0.002		0.001
- 0-15%	83% (75-91)		82% (74-90)	
- >15%	62% (48-75)		57% (42-72)	
Treatment group:		0.45		0.51
- RCHOP14	80% (71-89)		78% (67-88)	
- RCHOP21	70% (59-82)		70% (58-82)	
Multivariate analysis				
	Overall survival		Progression-free survival	
Parameter	RR (95% CI)	P	RR (95% CI)	P
Age > 60 years	3.19 (1.56-6.53)	0.002	—	—
RDI reduction >15%	2.63 (1.32-5.26)	0.006	2.42 (1.24-4.69)	0.009
ECOG PS > 1	2.25 (1.12-4.5)	0.022	—	—
Unfavorable R-IPI	—	—	2.62 (1.35-5.09)	0.005

OS: overall survival; PFS: progression-free survival; ECOG PS: Eastern Cooperative Oncology Group performance status; LDH: lactate dehydrogenase; a-IPI: age-adjusted international prognosis index; R-IPI: revised International Prognosis Index; NCCN-IPI: enhanced International Prognostic Index; RDI: relative dose-intensity; R-CHOP: rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, prednisone.

doi:10.1371/journal.pone.0123978.t002

Table 3. Prognostic factors influencing OS and PFS.

	R-CHOP14 group				R-CHOP21 group			
	5y-OS	P	5y-PFS	P	5y-OS	P	5y-PFS	P
Age:		0.057		0.2		0.006		0.17
- 0-60	86% (76-96)		80% (69-91)		86% (70-100)		81% (61-100)	
- >60	71% (54-87)		70% (52-87)		62% (47-77)		64% (49-79)	
Sex:		0.92		0.86		0.63		0.85
- Male	80% (69-91)		78% (66-90)		74% (57-92)		71% (55-87)	
- Female	80% (66-95)		74% (59-90)		67% (52-83)		70% (54-87)	
ECOG PS:		0.021		0.19		0.032		0.34
- 0-1	84% (74-93)		79% (69-89)		75% (62-89)		73% (55-90)	
- 2-4	67% (45-88)		66% (42-90)		53% (29-77)		61% (47-74)	
Ann Arbor stage:		0.09		0.01		0.82		0.17
- I-II	85% (73-97)		91% (81-100)		72% (56-87)		81% (54-100)	
- III-IV	76% (64-88)		65% (51-80)		68% (50-87)		60% (46-74)	
B-symptoms:		<0.001		0.005		0.88		0.39
- No	91% (83-98)		85% (75-95)		72% (59-86)		76% (57-95)	
- Yes	57% (38-76)		55% (34-76)		65% (43-88)		58% (34-81)	
LDH:		0.24		0.057		0.41		0.48
- Normal	90% (80-99)		84% (72-96)		76% (61-91)		75% (59-91)	
- Elevated	69% (55-84)		70% (54-85)		62% (44-81)		64% (45-82)	
Extranodal sites:		0.14		0.27		0.73		0.93
- 0-1	85% (77-94)		78% (67-88)		70% (58-83)		70% (52-89)	
- > 1	63% (41-85)		71% (49-92)		71% (38-100)		73% (41-100)	
Bulky disease:		0.45		0.049		0.65		0.95
- No	85% (75-95)		82% (71-94)		67% (52-82)		68% (53-83)	
- Yes	73% (58-88)		67% (50-84)		78% (61-95)		75% (56-94)	
Beta-2-microglobulin:		0.38		0.46		0.008		0.27
- Normal	83% (72-94)		78% (66-90)		89% (78-100)		83% (70-97)	
- Elevated	77% (62-92)		74% (58-91)		61% (41-80)		65% (45-86)	
R-IPi:		0.18		0.010		0.023		0.022
- Low-int	87% (78-96)		85% (75-95)		78% (65-91)		81% (69-92)	
- High	65% (47-84)		60% (40-80)		55% (33-76)		49% (25-73)	
NCCN-IPi:		<0.001		0.014		0.059		0.18
- Low-int	82% (74-91)		78% (68-87)		72% (59-85)		70% (57-83)	
- High	25% (0-67)		50% (0-100)		38% (0-77)		44% (0-88)	
Radiotherapy:		0.16		0.79		0.73		0.18
- Yes	85% (72-98)		78% (62-93)		77% (60-95)		82% (65-98)	
- No	78% (66-89)		75% (63-87)		66% (51-82)		64% (48-79)	
RDI reduction:		0.82		0.12		<0.001		<0.001
- 0-15%	79% (68-90)		82% (71-93)		88% (77-98)		82% (71-94)	
- >15%	82% (67-96)		65% (47-84)		37% (27-48)		43% (19-67)	

R-CHOP: rituximab, cyclophosphamide, adriamycin, vincristine, prednisone. OS: overall survival. PFS: progression free survival. ECOG PS: Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status. LDH: lactate dehydrogenase. R-IPi: revised international prognosis index. NCCN-IPi: an enhanced international prognostic index. RDI: relative dose-intensity.

doi:10.1371/journal.pone.0123978.t003

Table 4. Multivariate analysis.

R-CHOP21 cohort						
Parameter	p	Overall survival		p	Progression-free survival	
		RR (exp. B)	95% CI		RR (exp. B)	95% CI
RDI reduction >15%	<0.001	7.41	2.51–21.83	0.001	4.41	1.77–10.99
Unfavourable R-IPi	0.032	2.99	1.1–8.16	—	—	—
R-CHOP14 cohort						
Parameter	p	Overall survival		p	Progression-free survival	
		RR (exp. B)	95% CI		RR (exp. B)	95% CI
High NCCN-IPi	0.005	7.09	1.83–27.42	—	—	—
B-symptoms	<0.001	5.37	2.11–13.7	—	—	—
Ann Arbor stage	—	—	—	0.004	6.26	1.77–22.13
Bulky disease	—	—	—	0.005	4.05	1.54–10.67

R-CHOP: rituximab, cyclophosphamide, adriamycin, vincristine, prednisone. RDI: relative dose-intensity. RR: relative risk. R-IPi: revised international prognosis index. NCCN-IPi: an enhanced international prognostic index.

doi:10.1371/journal.pone.0123978.t004

By contrast, in the R-CHOP14 group an unfavorable NCCN-IPi (RR 7.09) and the presence of B-symptoms (RR 5.37) was independently associated with worse OS, and a AA stage III-IV (RR 6.26) and bulky disease (RR 4.05) were independently related to worse PFS. RDI reductions showed no statistical significance on OS or PFS in patients treated with R-CHOP14. However there was a mild trend towards a better PFS in patients with RDI reduction lower than 15%. This may suggest that in R-CHOP14 it is also an important factor but that patients treated with R-CHOP14 have a wider margin of security associated with its higher dose-density (Fig 2).

Discussion

R-CHOP21 remains the standard of care for patients with DLBCL. In recent phase III trials an increase in dose-density did not lead to a better outcome. There were no differences observed in terms of response, PFS or OS between R-CHOP21 and R-CHOP14 [7, 8]. In our series we also found no differences, with both regimens showing a similar outcome (Fig 1).

Furthermore, R-CHOP14 proved to be more toxic and there were more difficulties in maintaining RDI in the GELA study. In our series, RDI reductions showed a tendency to be higher in the R-CHOP14 cohort (9.2% versus 5.8% in the R-CHOP21 cohort) (p = 0.094). Delarue et al. reported a median RDI reduction of around 12% for R-CHOP14, and 2% for R-CHOP21 (p<0.001) [8]. Another British trial reported similar median RDI between groups [7]. However, in both trials the R-CHOP14 median RDI of all important drugs relative to R-CHOP21 patients was 134% and 150%, respectively. With both regimens having similar effectiveness, the

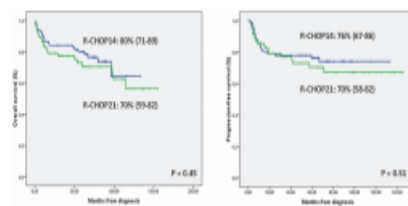


Fig 1. 5-year OS and PFS in R-CHOP21 and R-CHOP14 cohorts.

doi:10.1371/journal.pone.0123978.g001

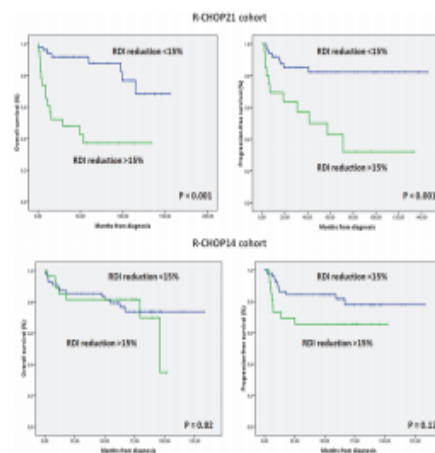


Fig 2. Differential impact of RDI reduction in R-CHOP21 and R-CHOP14 cohorts.

doi:10.1371/journal.pone.0123978.g002

direct consequence is that RDI reductions seem to have much more relevance in R-CHOP21 than in R-CHOP14.

RDI is an important issue in oncology. Early studies analyzed its role in breast cancer and other malignancies such as Hodgkin lymphoma [26, 27]. Dose intensity (DI) represents the amount (mg/m²) of a drug administered per unit time (week) and RDI reflects whether DI was implemented as planned. Multiple works have reported a correlation between RDI and survival prognosis.

In 1990 the impact of RDI in DLBCL was described using CHOP regimen or others with higher intensity [16–18]. After the addition of rituximab to the CHOP scheme (R-CHOP), another report described that mortality was affected by RDI [20]. In these works several cutoffs were used to define RDI reduction: 25%, 15% and median RDI. In our analysis we selected 15%, as this is the most used in RDI studies, both in lymphoma and solid malignancies. Nevertheless, we also tried several cutoffs and finally this was the best one for balancing clinical value and statistical potency.

As expected, in our series RDI reductions only made an impact on the R-CHOP21 group but not R-CHOP14 (Fig 2). Moreover, in the R-CHOP21 group, a greater than 15% reduction in RDI was independently associated with both OS and PFS, with R-IPI also independently influencing OS while RDI reductions had no impact in the R-CHOP14 group. In fact, patients, with and without a greater than 15% reduction, had 82% and 79% 5y-OS ($p = 0.82$) and 65% and 82% 5y-PFS ($p = 0.12$), respectively.

Nonetheless, in most large-scale clinical trials RDI tends to remain satisfactory. However, for several reasons in routine clinical practice it is not always easy to maintain RDI. The first step to manage this problem is to realize that the problem exists, and the second is to analyze the causes and potential solutions. We demonstrate that in the past in our center we have had this problem, as the 31% of patients that suffered greater than 15% of RDI reduction fared worse than patients without this reduction in patients treated with R-CHOP21 but not for the 34% with the same reduction that received R-CHOP14 (in either our center or the other two participating hospitals). Furthermore, this was independent of standard clinical prognostic factors.

The reasons for these RDI reductions were: advanced age, comorbidities, hematologic toxicity or complications such as infections, patient's social factors or calendar conflicts. In our R-CHOP21 cohort half of these reductions were related to age and comorbidities but also to toxic events including infections, which may be anticipated or carefully monitored. Older patients often do not receive the same dose intensity or density as young patients. Lyman et al. reported several independent prognostic factors of dose-intensity reduction: age older than 60 years, advanced disease stage, poor performance status, and no prophylactic G-CSF use [28]. Interestingly, age was no longer a significant risk factor in patients who received G-CSF.

With this in mind, and considering the risk of hematologic toxicity, predictive models based on the identified risk factors for reduced RDI should be considered to decide the appropriate supportive care, including administration of hematopoietic growth factors, which facilitates the delivery of full chemotherapy dose. Zelenetz [29] identified older age, low albumin, presence of hepatic dysfunction, bone marrow involvement by the disease and/or low neutrophil at diagnosis as predicting factors for high risk of neutropenia in the first cycle of chemotherapy and thereby potential risk for lower dose intensity. Intragumtornchai et al. [30] have proposed another model for predicting life-threatening neutropenia after the first course of CHOP in aggressive NHL without taking age into account. In this model, the presence of low albumin levels, high LDH and bone marrow involvement by the lymphoma predicted a 72% rate of febrile neutropenia with full dose of CHOP as the therapeutic regimen.

Other studies focused on the possibility of delivering full doses of active drugs in older patients by using growth factors assuming that this may have an impact on the outcome [4, 31]. By taking into consideration all this evidence, guidelines have been developed that recommend the use of G-CSF in older patients receiving treatment with intention to cure [24, 25]. Growth factors should be administered to patients receiving chemotherapy associated with febrile neutropenia ($\geq 20\%$) or to patients for whom reductions in chemotherapy dose density or intensity are known to be associated with poor prognosis.

Doxorubicin is a key drug in the treatment of this type of lymphoma but it is often withheld from older patients because of its cardiotoxicity [32]. Hershman et al. [33] reported that older patients with DLCL receiving doxorubicin were more likely to develop chronic heart failure, with hypertension being the only synergistic risk factor with this drug. Less cardiotoxic formulations of doxorubicin, such as liposomal doxorubicin, may be less cardiotoxic and with a similar outcome [34].

Patient's social factors or calendar conflicts may generate RDI reductions. Some associated with the patient and others to the Health System: waiting lists and work overload exceeding system capacity. In both cases the key is that patients and physicians recognize the importance of RDI in DLBCL treated with R-CHOP21.

Overall in our series there were no differences in terms of response or survival between patients treated with R-CHOP21 or R-CHOP14. A tendency towards a higher rate of RDI reduction was observed in the R-CHOP14 group. However, the impact of RDI reductions on response and survival was only observed in the R-CHOP21 group but not in patients treated with R-CHOP14. We conclude that, if RDI reductions are avoided, R-CHOP21 and R-CHOP14 are equivalent regimens in terms of response and survival. For patients receiving R-CHOP21 we recommend using clinical and support measures in order to avoid RDI reductions.

Acknowledgments

We thank Mr. Jonathan McFarland for his contribution in the revision of English language of the manuscript.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: AG LB. Performed the experiments: RR JMS. Analyzed the data: AG LB Francesc Garcia AS J. Besalduch. Contributed reagents/materials/analysis tools: LB AMBG Francesc Garcia BS CM JG LG EG MF RDC J. Bargay AP JV MS AP CB Florencia Garcia AS JB. Wrote the paper: AG LB.

References

1. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al., editors. Lyon 2008.
2. Fisher RI, Gaynor ER, Dahlborg S, Oken MM, Grogan TM, Mize EM, et al. Comparison of a standard regimen (CHOP) with three intensive chemotherapy regimens for advanced non-Hodgkin's lymphoma. *The New England journal of medicine*. 1993; 328(14):1002–6. Epub 1993/04/08. PMID: [7680764](#)
3. Linch DC, Yung L, Smith P, MacLennan K, Jack A, Hancock B, et al. Final analysis of the UKLGLY02 trial comparing 6–8 cycles of CHOP with 3 cycles of CHOP followed by a BEAM autograft in patients <65 years with poor prognosis histologically aggressive NHL. *British journal of haematology*. 2010; 149(2):237–43. Epub 2010/03/06. doi: [10.1111/j.1365-2141.2010.08081.x](#) PMID: [20201949](#)
4. Pfreundschuh M, Trumper L, Kloess M, Schmits R, Feller AC, Rube C, et al. Two-weekly or 3-weekly CHOP chemotherapy with or without etoposide for the treatment of elderly patients with aggressive lymphomas: results of the NHL-B2 trial of the DSHNHL. *Blood*. 2004; 104(3):634–41. Epub 2004/03/16. PMID: [15016643](#)
5. 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. *The New England journal of medicine*. 2002; 346(4):235–42. Epub 2002/01/25. PMID: [11807147](#)
6. Habermann TM, Weller EA, Morrison VA, Gascoyne RD, Cassileth PA, Cohn JB, et al. Rituximab-CHOP versus CHOP alone or with maintenance rituximab in older patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2006; 24(19):3121–7. Epub 2006/06/07.
7. Cunningham D, Hawkes EA, Jack A, Qian W, Smith P, Mouncey P, et al. Rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisolone in patients with newly diagnosed diffuse large B-cell non-Hodgkin lymphoma: a phase 3 comparison of dose intensification with 14-day versus 21-day cycles. *Lancet*. 2013; 381(9880):1817–26. Epub 2013/04/26. doi: [10.1016/S0140-6736\(13\)60313-X](#) PMID: [23615461](#)
8. Delarue R, Tilly H, Mounier N, Petrella T, Salles G, Thieblemont C, et al. Dose-dense rituximab-CHOP compared with standard rituximab-CHOP in elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma (the LNH03-6B study): a randomised phase 3 trial. *The lancet oncology*. 2013; 14(6):525–33. Epub 2013/04/13. doi: [10.1016/S1470-2045\(13\)70122-0](#) PMID: [23578722](#)
9. A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project. *The New England journal of medicine*. 1993; 329(14):967–94. Epub 1993/09/30. PMID: [8141877](#)
10. Sehn LH, Berry B, Chhanabhai M, Fitzgerald C, Gill K, Hoskins P, et al. The revised International Prognostic Index (R-IPI) is a better predictor of outcome than the standard IPI for patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *Blood*. 2007; 109(5):1857–61. Epub 2006/11/16. PMID: [17105812](#)
11. Zhou Z, Sehn LH, Rademaker AW, Gordon LI, Lacasce AS, Crosby-Thompson A, et al. An enhanced International Prognostic Index (NCCN-IPI) for patients with diffuse large B-cell lymphoma treated in the rituximab era. *Blood*. 2014; 123(6):837–42. Epub 2013/11/23. doi: [10.1182/blood-2013-09-524108](#) PMID: [24264230](#)
12. Hryniuk WM, Goodyear M. The calculation of received dose intensity. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 1990; 8(12):1935–7. Epub 1990/12/01.
13. Hryniuk WM. The importance of dose intensity in the outcome of chemotherapy. In: Hellman S, De Vita V, Rosenberg S, editors. *Important advances in oncology*. Philadelphia: J.B. Lippincott Company; 1988. p. 121–41. PMID: [3042601](#)
14. Landgren O, Algeon C, Axedorp U, Nilsson B, Wedelin C, Porwit-MacDonald A, et al. Hodgkin's lymphoma in the elderly with special reference to type and intensity of chemotherapy in relation to prognosis. *Haematologica*. 2003; 88(4):438–44. Epub 2003/04/19. PMID: [12681971](#)
15. van Rijswijk RE, Haanen C, Dekker AW, de Meijer AJ, Verbeek J. Dose intensity of MOPP chemotherapy and survival in Hodgkin's disease. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 1989; 7(12):1776–82. Epub 1989/12/01.

16. Kwak LW, Halpern J, Olshen RA, Horning SJ. Prognostic significance of actual dose intensity in diffuse large-cell lymphoma: results of a tree-structured survival analysis. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 1990; 8(6):963–77. Epub 1990/06/01.
17. Lepage E, Gisselbrecht C, Haioun C, Sebban C, Tilly H, Bosly A, et al. Prognostic significance of received relative dose intensity in non-Hodgkin's lymphoma patients: application to LNH-87 protocol. The GELA. (Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte). *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 1993; 4(8):651–6. Epub 1993/09/01. PMID: [7694634](#)
18. Bosly A, Bron D, Van Hoof A, De Bock R, Berneman Z, Ferrant A, et al. Achievement of optimal average relative dose intensity and correlation with survival in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with CHOP. *Annals of hematology*. 2008; 87(4):277–83. Epub 2007/10/24. PMID: [17952688](#)
19. Cheson BD, Horning SJ, Coiffier B, Shipp MA, Fisher RI, Connors JM, et al. Report of an international workshop to standardize response criteria for non-Hodgkin's lymphomas. NCI Sponsored International Working Group. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 1999; 17(4):1244. Epub 1999/11/24.
20. Yamaguchi H, Hirakawa T, Inokuchi K. Importance of relative dose intensity in chemotherapy for diffuse large B-cell lymphoma. *Journal of clinical and experimental hematopathology: JCEH*. 2011; 51(1):1–5. Epub 2011/06/02. PMID: [21628854](#)
21. Kaplan E, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc*. 1958; 53:457–81.
22. Peto R, Pike MC, Armitage P, Breslow NE, Cox DR, Howard SV, et al. Design and analysis of randomized clinical trials requiring prolonged observation of each patient. II. analysis and examples. *Br J Cancer*. 1977; 35(1):1–39. PMID: [631755](#)
23. Cox DR. Regression models and life-tables. *J R Stat Soc*. 1972; 34:187.
24. Aapro MS, Bohlius J, Cameron DA, Dal Lago L, Donnelly JP, Kearney N, et al. 2010 update of EORTC guidelines for the use of granulocyte-colony stimulating factor to reduce the incidence of chemotherapy-induced febrile neutropenia in adult patients with lymphoproliferative disorders and solid tumours. *Eur J Cancer*. 2011; 47(1):8–32. Epub 2010/11/26. doi: [10.1016/j.ejca.2010.10.013](#) PMID: [21095116](#)
25. Smith TJ, Khatcheressian J, Lyman GH, Ozer H, Armitage JO, Balducci L, et al. 2006 update of recommendations for the use of white blood cell growth factors: an evidence-based clinical practice guideline. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2006; 24(19):3187–205. Epub 2006/05/10.
26. Green JA, Dawson AA, Fell LF, Murray S. Measurement of drug dosage intensity in MVPP therapy in Hodgkin's disease. *British journal of clinical pharmacology*. 1980; 9(5):511–4. Epub 1980/05/01. PMID: [6893156](#)
27. Hryniuk W, Bush H. The importance of dose intensity in chemotherapy of metastatic breast cancer. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 1984; 2(11):1281–8. Epub 1984/11/01.
28. Lyman GH, Dale DC, Friedberg J, Crawford J, Fisher RL. Incidence and predictors of low chemotherapy dose-intensity in aggressive non-Hodgkin's lymphoma: a nationwide study. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2004; 22(21):4302–11. Epub 2004/09/24.
29. Zelenetz AD. Risk models for chemotherapy-induced neutropenia in non-Hodgkin's lymphoma. *Oncology (Williston Park)*. 2003; 17(11 Suppl 11):21–6. Epub 2003/12/20.
30. Intragumtornchai T, Sutheesophon J, Sutcharitchan P, Swasdikul D. A predictive model for life-threatening neutropenia and febrile neutropenia after the first course of CHOP chemotherapy in patients with aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Leukemia & lymphoma*. 2000; 37(3–4):351–60. Epub 2000/04/07.
31. Doorduijn JK, van der Holt B, van Imhoff GW, van der Hem KG, Kramer MH, van Oers MH, et al. CHOP compared with CHOP plus granulocyte colony-stimulating factor in elderly patients with aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2003; 21(16):3041–50. Epub 2003/08/14.
32. Robert J, Hoerni B. Age dependence of the early-phase pharmacokinetics of doxorubicin. *Cancer research*. 1983; 43(9):4467–9. Epub 1983/09/01. PMID: [6871877](#)
33. Hershman DL, McBride RB, Eisenberger A, Tsai WY, Grann VR, Jacobson JS. Doxorubicin, cardiac risk factors, and cardiac toxicity in elderly patients with diffuse B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2008; 26(19):3159–65. Epub 2008/07/02.
34. Luminari S, Montanini A, Caballero D, Bologna S, Natter M, Dyer MJ, et al. Nonpegylated liposomal doxorubicin (Myocet) combination (R-COMP) chemotherapy in elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL): results from the phase II EUR018 trial. *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2010; 21(7):1492–9. Epub 2009/12/17. doi: [10.1093/annonc/mdp544](#) PMID: [20007997](#)